Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV Klinik der Universität München Direktor: Prof. Dr. Martin Reincke

Rolle der Nekroinflammation bei Progression der diabetischen Nephropathie

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

> vorgelegt von Bao Vi Nguyen

> > aus Dortmund

> > > Jahr 2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Mitberichterstatter: Prof. Dr. Volker Vielhauer Prof. Dr. Holger Schmid Prof. Dr. Christoph Dodt

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:

Dekan:

Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.01.2025

Meinen Eltern und meiner Schwester in Dankbarkeit gewidmet.

Dành tặng cho ba mẹ và chị tôi với lòng biết ơn.

Inhaltsverzeichnis

Inh	altsver	zeichnis	4
Ab	bildung	jsverzeichnis	7
Tab	bellenv	erzeichnis	9
Ab	kürzun	gsverzeichnis	10
Zus	samme	nfassung	14
Ab	stract		16
1.	Eir	nleitung	18
1.1	Die	e chronische Nierenerkrankung	18
	1.1.1	Klinische Relevanz der chronischen Nierenerkrankung	18
	1.1.2	Bedeutung der diabetischen Nephropathie	19
1.2	Ph	ysiologie der Niere	21
1.3	Die	e diabetische Nephropathie	23
	1.3.1	Physiologie der Blutzucker-Regulation	24
	1.3.2	Diabetes mellitus	24
	1.3.3	Renale Auswirkungen der Hyperglykämie	25
	1.3.4	Pathologie	27
1.4	Die	Nekroptose	29
	1.4.1	Formen des Zelluntergangs	29
	1.4.2	Überblick über die Signaltransduktion	31
	1.4.3	Intrazelluläre Proteine der Signaltransduktionskaskade	34
	1.4.4	A20 und weitere Inhibitoren der Nekroptose	36
1.5	Hy	pothese und Fragestellung	37
2.	Ма	terial und Methoden	39
2.1	Ма	terialen	39
	2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	39
	2.1.2	Chemikalien, Lösungen und Puffer	41
	2.1.3	Antikörper und Enzyme	47
	2.1.4	Primer	48
	2.1.5	Software	49
2.2	Tie	rexperimentelle Methoden	50
	2.2.1	Versuchstiere	50
	2.2.2	Genotypisierung	51
	2.2.3	Tierhaltung	52
	2.2.4	Überblick Versuchsablauf	53
	2.2.5	Injektionsnarkose und Antagonisierung	53
	2.2.6	Unilaterale Nephrektomie	54
	2.2.7	Induktion des Diabetes	55
	2.2.8	Regelmäßige Messung von Gewicht und Blutzucker, Urinentnahme	56
	2.2.9	Nicht-invasive transkutane Messung der renalen Funktion	
	2.2.10	Gewebersolation	58

2.3	Im	munologische Methoden	59
	2.3.1	Durchflusszytometrie	59
	2.3.2	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	63
2.4	His	stologische und immunhistochemische Methoden	65
	2.4.1	Gewebeaufbereitung zur Herstellung lichtmikroskopischer Präparate	65
	2.4.2	Histopathologische Untersuchung	65
	2.4.3	Immunhistochemische Färbung	66
	2.4.4	Immunfluoreszenzfärbung	67
2.5	Мо	ekularbiologische Methoden	68
	2.5.1	RNA-Isolierung	68
	2.5.2	Reinheits- und Konzentrationsbestimmung der RNA	68
	2.5.3	Reverse Transkription der RNA zu cDNA	68
	2.5.4	Quantitative Real Time-PCR	69
2.6	Sta	atistische Analysen	71
2	г.,	nah viena	70
3. 0.1	Er		73
3.1	Ve im	rlauf der diabetischen Nephropathie in Ripk1kd-, Ripk3kd- und Miki-/- Mausen	73
	3.1.1	Der Erfolg der Diabetesinduktion	73
	3.1.2	Mortalität und Gewichtsverlauf	76
	3.1.3	Funktionelle Nierenparameter	78
	3.1.4	Struktureller Schaden	80
	3.1.5	Renaler Zelltod	81
	3.1.6	Renale Leukozyteninfiltration	82
	3.1.7	Kompartimentspezifische Leukozyteninfiltration	85
	3.1.8	Renale Entzündungsmediatoren	88
	3.1.9	Renale Zellschädigung und Fibrosierung	91
	3.1.10	Zusammenfassung des Phänotyps von Ripk1kd-, Ripk3kd- und Mlkl-/- Mäusen im Modell der diabetischen Nephropathie	93
3.2	Die	e A20-defiziente Maus im Modell der diabetischen Nephropathie	95
	3.2.1	Der Erfolg der Diabetesinduktion	95
	3.2.2	Mortalität und Gewichtsverlauf	97
	3.2.3	Funktionelle Nierenparameter	99
	3.2.4	Struktureller Schaden	101
	3.2.5	Renaler Zelltod	102
	3.2.6	Renale Leukozyteninfiltration	104
	3.2.7	Kompartimentspezifische Leukozyteninfiltration	107
	3.2.8	Renale Entzündungsmediatoren	109
	3.2.9	Renale Zellschädigung und Fibrosierung	112
	3.2.10	Zusammenfassung der Phänotypanalyse A20-defizienter Mäuse im Modell der diabetischen Nephropathie	114
4.	Di	skussion	. 116
4.1	Er	olgreiche Diabetesinduktion in allen Versuchsgruppen	117
4.2	Мо	ortalität und Gewichtsverlauf nach der STZ-Injektion	118
4.3	Ve	rlauf der diabetischen Nephropathie in Ripk1kd-, Ripk3kd- und Mlkl-/- Mäusen	119
	4.3.1	Möglicher nephroprotektiver Effekt einer Mlkl-Defizienz bei diabetischer Nierenschädigung	110

	4.3.2	Effekte der fehlenden Kinaseaktivität von Ripk1 und Ripk3 bei der diabetischen Nephropathie	121
4.4	Ve	rlauf der diabetischen Nephropathie in A20-defizienten Versuchstieren	123
	4.4.1	A20-Defizienz verstärkt renale Entzündungsaktivität und fibrotischen Gewebeumbau ohne deutliche Verschlechterung der diabetischen Nierenschädigung	123
	4.4.2	Fehlender Effekt der A20-Defizienz auf das Ausmaß der diabetischen Nierenschädigung	124
4.5	Lin	nitationen der Arbeit	125
4.6	Zu	sammenfassung und Ausblick	125
Lit	eraturv	erzeichnis	127
Da	Danksagung		
Aff	idat		138

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: [Diagnoseverteilung der Patienten bei Therapiebeginn der Dialvsebehandlung (Inzidenz) im Jahr 2006 (4)	20
Abbildung 2: [Diagnoseverteilung der Patienten bei Therapiebeginn der Diagnoseverteilung (Inzidenz) im Jahresvergleich (4)	20
Abbildung 2: L	diatalogization und foinetrukturallar Aufhau das Clamarulus (11)	02 20
Abbildung 3. r	Histologischer und reinstruktureiler Aufbau des Glomerulus (TT)	۲۲ دد
Abbildung 4. F	Nephron und Sammellonisystem (14)	د∠ حد
Abbildung 5: F	Pathophysiologie der Diabetischen Nephropathie, modifiziert nach (26)	21
Abbildung 6: F	Pathologische Lasionen bei der diabetischen Nephropathie (33)	28
Abbildung 7: F	Renale Veranderungen beim Diabetes mellitus Typ 1 (26)	29
Abbildung 8: N	Morphologische Merkmale der Apoptose und Nekroptose (40)	30
Abbildung 9: Z	Zentrale Rolle der Nekroptose bei Erkrankungen des Menschen (58)	32
Abbildung 10:	Signalkaskade der Nekroptose (57)	33
Abbildung 11:	Funktionelle Domänen und Tertiärstruktur von RIPK1 und RIPK3 (66)	35
Abbildung 12:	Allgemeine Prinzipien der Regulation der TNF-induzierten Zelltodsignalwegs durch A20-vermittelte Deubiquitinierung, modifiziert nach (86)	37
Abbildung 13:	Genotypisierung der A20+/- Versuchstiere	52
Abbildung 14:	Ablauf des Tiermodells der diabetischen Nephropathie	53
Abbildung 15:	Wirkung von Streptozotocin in ß-Zellen (105)	55
Abbildung 16:	Gerät zur transkutanen Messung der glomerulären Filtrationsrate, modifiziert nach (109)	58
Abbildung 17:	Durchflusszytometrische Gatingstrategie zur Bestimmung der renalen Leukozytenpopulation	63
Abbildung 18:	Blutglukose gemessen mit dem Blutzuckermessgerät ACCU-Chek Aviva im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT), Ripk1kd, Ripk3kd und Mlkl-/-	73
Abbildung 19:	Plasmaglukose und HbA1c-Wert zum Versuchsendpunkt (Woche 25) im Vergleich zwischen Wildtyp (WT)-, Ripk1kd-, Ripk3kd- und Mlkl-/- Mäusen	74
Abbildung 20:	Blutglukose gemessen mit dem Blutzuckermessgerät ACCU-Chek Aviva im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT), Ripk1kd, Ripk3kd und Mlkl-/-	74
Abbildung 21:	Plasmaglukose und HbA1c-Wert zum Versuchsendpunkt (Woche 25) im Vergleich zwischen Wildtyp (WT)-, Ripk1kd-, Ripk3kd- und Mlkl-/- Mäusen	75
Abbildung 22:	Prozentuale Erfolgsrate der Diabetesinduktion nach fünf Streptozotocin- Injektionen im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT), Ripk1kd, Ripk3kd und Mlkl-/	76
Abbildung 23:	Mortalität im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT), Ripk1kd, Ripk3kd und Mlkl-/	77
Abbildung 24:	Körpergewicht im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT), Ripk1kd, Ripk3kd und Mlkl-/	77
Abbildung 25:	Funktionelle Nierenparameter zum Versuchsendpunkt im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT), Ripk1kd, Ripk3kd und Mlkl-/	80
Abbildung 26:	Histologische Evaluation des renalen strukturellen Schadens im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT), Ripk1kd, Ripk3kd und Mlkl-/	81
Abbildung 27:	Evaluation des renalen Zelltods im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT), Ripk1kd, Ripk3kd und Mlkl-/	82
Abbildung 28:	Renale Leukozyteninfiltration im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT), Ripk1kd, Ripk3kd und Mlkl-/	85
Abbildung 29:	Kompartimentspezifische Leukozyteninfiltration im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT), Ripk1kd, Ripk3kd und Mlkl-/	88

Abbildung 30:	mRNA-Expression renaler Entzündungsmediatoren im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT), Ripk1kd, Ripk3kd und Mlkl-/	90
Abbildung 31:	Evaluation der renalen Zellschädigung und Fibrosierung im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT), Ripk1kd, Ripk3kd und Mlkl-/	93
Abbildung 32:	Blutglukose gemessen mit dem Blutzuckermessgerät ACCU-Chek Aviva im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT) und A20+/	95
Abbildung 33:	Plasmaglukose und HbA1c-Wert zum Versuchsendpunkt (Woche 27) im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT) und A20+/-, sowie den jeweiligen unbehandelten Kontrollgruppen	96
Abbildung 34:	Blutglukose gemessen mit dem Blutzuckermessgerät ACCU-Chek Aviva im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT) und A20+/	96
Abbildung 35:	Plasmaglukose und HbA1c-Wert zum Versuchsendpunkt (Woche 27) im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT) und A20+/-, sowie den jeweiligen naiven Kontrollgruppen	97
Abbildung 36:	Prozentuale Erfolgsrate der Diabetesinduktion nach fünf Streptozotocin- Injektionen im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT) und A20+/-	97
Abbildung 37:	Mortalität im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT) und A20+/-	98
Abbildung 38:	Körpergewicht im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT) und A20+/-	98
Abbildung 39:	Funktionelle Nierenparameter zum Versuchsendpunkt im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT) und A20+/-, sowie den jeweiligen unbehandelten Kontrollgruppen	100
Abbildung 40:	Histologische Evaluation des renalen strukturellen Schadens im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT) und A20+/-, sowie den jeweiligen unbehandelten Kontrollgruppen	102
Abbildung 41:	Evaluation des renalen Zelltods im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT) und A20+/-, sowie den jeweiligen unbehandelten Kontrollgruppen	103
Abbildung 42:	Renale Leukozyteninfiltration im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT) und A20+/-, sowie den jeweiligen unbehandelten Kontrollgruppen	106
Abbildung 43:	Kompartimentspezifische Leukozyteninfiltration im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT) und A20+/-, sowie den jeweiligen unbehandelten Kontrollgruppen	109
Abbildung 44:	mRNA-Expression renaler Entzündungsmediatoren im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT) und A20+/-, sowie den jeweiligen unbehandelten Kontrollgruppen	111
Abbildung 45:	Evaluation der renalen Zellschädigung und Fibrosierung im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT) und A20+/-, sowie den ieweiligen unbehandelten Kontrollgruppen	112
Abbildung 46:	Nekroptose-unabhängige Funktionen von MLKL (78)	121

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aufgaben der Niere modifiziert nach (11)	21
Tabelle 2: Insulinwirkung auf den Stoffwechsel nach (15)	24
Tabelle 3: Ansatz für den TBE-Puffer für die Gelelektrophorese	42
Tabelle 4: Ansatz für die Streptozotocin-Lösung	43
Tabelle 5: Ansätze für die bei der Durchflusszytometrie verwendeten Lösungen	44
Tabelle 6: Ansätze für die bei dem ELISA verwendeten Lösungen	45
Tabelle 7: Ansätze für die bei der histologischen Aufbereitung verwendeten Lösungen	46
Tabelle 8: Mastermixansatz mit SYBR für die PCR	47
Tabelle 9: Verwendete Real-Time PCR Primer	48
Tabelle 10: Einstellungsparameter für die Durchführung der PCR bei der Genotypisierung	51
Tabelle 11: Ansatz der Injektionsnarkose	53
Tabelle 12: Ansatz des Antagonistenmix	54
Tabelle 13: Mastermixansatz für die Reverse Transkription	69
Tabelle 14: Einstellungsparameter für die Durchführung der Real-Time-PCR zur	
mRNA-Expressionsanalyse	70
Tabelle 15: Ansatz mit Real-Time PCR Primer für die Expressionsanalyse	71

Abkürzungsverzeichnis

α-SMA	α-Smooth Muscle Actin
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
ADA	American Diabetes Association
ADH	Antidiuretisches Hormon
AGEs	Advanced Glycation Endproducts
AKI	Akutes Nierenversagen (engl. Acute Kidney Injury)
Alexa488/ 647	Alexa Fluor 488 und 647
APC	Allophycocyanin
APES	Ammoniumpersulfat
AT1	Angiotensin I
ATP	Adenosintriphosphat
AUKRA	Aurora-Kinase A
BAX	Bcl-2-Associated X Protein
BAK	Bcl-2 Homologous Antagonist Killer
BCL-2	B-cell Lymphoma 2
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C57BL/6	C57 Black 6
CCL2/ 5	CC-Chemokin-Ligand 2 und 5
CD	Cluster of Differentiation
cFLIP	Cellular FLICE-Like Inhibitory Protein
cIAP 1/2	Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1 and 2
Co	Kontrollgruppe (engl. Control group)
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
CT-Wert	Cycle Threshold- Wert
CXCL5/9/10	C-X-C Motif Chemokine Ligand 5/9/10
CYLD	Ubiquitin-Carboxyl-Terminale Hydrolase
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAI	DNA-Dependent Activator of Interferon-Regulatory Factor
DAMPs	Danger Associated Molecular Patterns
DD	Todesdomäne (engl. Death Domain)
DM	Diabetes mellitus
DN	Diabetische Nephropathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Deoxyribonucleic Acid)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPBS	Phosphate Buffered Saline
DTT	Dithiothreitol
DUB	Deubiquitinierung
et al.	Lat. `und andere'

EDTA	Ethylendiamintetraacetat/ Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERHR3	Erbium Hydride
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FADD	Fas-assoziiertes Protein mit Todesdomäne (engl. Fas-Associating Death Domain-Containing Protein)
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FSC	Forward Scatter
FSP-1	Ferroptosis Suppressor Protein 1
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GLUT 2	Glukosetransporter 2
HbA1c	Hämoglobin A1c
HBSS	Hank's balanced salt solution
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. Horseradish Peroxidase)
ID	Intermediärdomäne
IFN-α/ γ	Interferon- α/ γ
IFNAR	Interferon- (α/β-) Rezeptor
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL-1β/ 6/10	Interleukin 1β/ 6/ 10
iNOS	Induzierbarer Stickstoffmonoxidsynthetase
KD	Kinase Domäne
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
KIM-1	Kidney Injury Molecule-1
Ly6	Lymphocyte Antigen 6 Complex
LPS	Lipopolysaccharide
MLKL	Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein
MPT	Mitochondrial Permeability Transition
mPTP	Mitochondriales Permeabilitäts-Übergangsporenkomplex (engl. Mitochondrial Permeability Transition Pore)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. Messenger Ribonucleic Acid)
Nec-1/ Nec-1s	Necrostatin-1(s)
NEMO	NF-kB Essential Modulator
NF-кВ	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of Activated B-cells
NGAL	Neutrophilengelatinase-assoziierte Lipocalin
NIC-Kidney Device	Non-invasive Clearance- Kidney Device
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	Non-Obese Diabetic
NOD2	Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing Protein 2
OD	Optische Dichte
OTU	Ovarian Tumor

PAS	Periodic Acid-Schiff stain
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction)
PE	Phycoerythrin
PE.Cy5	Phycoerythrin-Cyanin 5
PGAM	Phosphoglyceratmutase
PGK-neo Kasette	Phosphoglycerate Kinase- Neo Kasette
PPM1B	Mg ²⁺ /Mn ²⁺ -abhängige Proteinphosphatase
PRRs	Pattern-Recognition Rezeptoren
qPCR	Quantitative PCR (auch Real-Time PCR genannt)
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RHIM	RIP Homotypic Interaction Motif
RIPK1	Receptor-Interacting Serine/threonine-Protein Kinase 1
Ripk1kd	Receptor-Interacting Serine/threonine-Protein Kinase 1 kinase dead
RIPK3	Receptor-Interacting Serine/threonine-Protein Kinase 3
Ripk3kd	Receptor-Interacting Serine/threonine-Protein Kinase 3 kinase dead
RNA	Ribonukleinsäure (engl. Ribonucleic Acid)
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (engl. Standard Error of the Mean)
SGLT 2	Natrium-Glukose-Transporter 2
SPF	Specific-Pathogen-Free
SSC	Side Scatter
STUB1	STIP1 Homology and U-box Containing Protein
STZ	Streptozocin
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TdT	Terminale Desoxynucleotid Transferase
TGF-β	Transforming Growth Factor β
TLR3/4	Toll-like Rezeptor 3 and 4
ТМВ	Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TNFR1/2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ1 und 2
TNFAIP3	TNF-α-induziertes Protein 3
TRADD	TNFR Type 1-Associated Death Domain
TRAF2/5	TNF Receptor Associated Factor 2 and 5
TRIF	TIR Domain-Containing Adaptor-Inducing Interferon-β
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT)-Mediated dUTP Nick End Labeling
UV-Licht	Ultraviolett-Licht

VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZF4	Zinkfinger 4

Zusammenfassung

Die diabetische Nephropathie stellt als eine der häufigsten Grundleiden einer terminalen Niereninsuffizienz eine Erkrankung mit hoher Mortalität und einer hohen sozioökonomischen Belastung dar. Durch die chronische Hyperglykämie entstehen renale Schädigungen mit einem exkretorischen Funktionsverlust der Nieren, einer Läsion der Filtrationsbarriere sowie einer Sklerosierung und Fibrosierung des Organgewebes. Die bisher nicht gänzlich erforschten Pathomechanismen beinhalten auch Zelluntergang, der mit einer renalen Entzündungsreaktion einhergeht. Diese Nekroinflammation kann auf Formen des regulierten Zelltods wie der Nekroptose basieren. Durch unterschiedliche auf der Zellmembran exprimierte Rezeptoren kann die Nekroptose aktiviert werden, sodass über intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden unter Einbeziehung der Adaptermoleküle Receptor-Interacting Protein Kinase (RIPK) 1, RIPK3 und Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein (MLKL) am Ende eine Ruptur der Plasmamembran vermittelt wird. Aus dieser gelangt Zellinhalt in den extrazellulären Raum, was eine Inflammation auslöst. Ein physiologischer negativer Regulator der Nekroinflammation ist das intrazelluläre anti-nekroptotische und anti-inflammatorische Protein A20. Durch Interaktion mit den Adaptermolekülen RIPK1 und RIPK3 setzt es die nekroptotische Aktivität herab.

Ziel dieser Arbeit war, eine mögliche Rolle der Nekroinflammation bei der Progression der diabetischen Nephropathie im Tiermodell nachzuweisen. Dafür wurden C57BL/6 Wildtyp-Mäuse und transgene Mäuse mit inaktivierter Kinaseaktivität von RIPK1 oder RIPK3 (Ripk1kd- und Ripk3kd-Mäuse), wie auch einem Gen-Knockout für MLKL (Mlkl-/- Mäuse) verwendet. Für die Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von A20 wurden zudem heterozygot defiziente A20+/- Mäuse genutzt. In diesen Versuchstieren wurde nach einer unilateralen Nephrektomie (zur Aggravierung des späteren Nierenschadens) ein Diabetes mellitus durch wiederholte intraperitoneale Streptozotocin-Injektionen induziert. Die sich entwickelnde diabetische Nephropathie wurde über einen Versuchszeitraum von 25 bzw. 27 Wochen beobachtet. Am Versuchsendpunkt wurde in den Versuchsgruppen die funktionellen Nierenparameter, die morphologischen Veränderungen der Nieren, der renale Zelluntergang und das Ausmaß der Inflammation verglichen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine erfolgreiche Etablierung des diabetischen Modells nach Streptozotocin-Injektionen in allen Versuchsgruppen. Im ersten Teil dieser Arbeit konnte ein möglicher nephroprotektiver Effekt einer Mlkl-Defizienz nachgewiesen werden. Funktionelle Nierenparameter (gemessene glomeruläre Filtrationsrate vor Versuchsende, Plasmaharnstoffkonzentration, Albuminurie) unterschieden sich zwischen diabetischen Wildtyp- und Ripk1kd-, Ripk3kd- oder Mlkl-/- Mäusen nicht signifikant. Allerdings zeigten diabetische Mlkl-/-Mäuse eine verminderte Hypoalbuminämie und Hypercholesterinämie als Hinweis auf einen geringeren Schaden der glomerulären Filtrationsbarriere bei proteinurischer Nephropathie. Zudem wiesen diabetische Mlkl-/- Mäuse als Zeichen einer geringeren glomerulären Schädigung und Hyperfiltration signifikant kleinere Glomeruli als Wildtyp-Tiere auf. Hinsichtlich des renalen Zelltods ergaben sich keine Unterschiede zwischen diabetischen Wildtyp-Tieren und den drei transgenen Versuchsgruppen. Dagegen zeigte sich eine signifikant verminderte glomeruläre, jedoch nicht tubulointerstitielle Infiltration von T-Lymphozyten und Makrophagen in den diabetischen Mlkl-/- Mäusen. Dies korrelierte mit einer geringeren Expression renaler Entzündungsmediatoren wie Tnf-α und II-10 und dem extrazellulären Matrixprotein Laminin bei Mlkl-Defizienz. In diabetischen Ripk1kd- und Ripk3kd-Mäusen waren einzelne Parameter wie tubulointerstielle Makrophageninfiltration oder renale Expression einzelner Entzündungsmediatoren ebenfalls reduziert, dies korrelierte jedoch nicht mit einer verminderten renalen Schädigung.

Die Auswertung der A20+/- Mäuse im zweiten Teil der Arbeit zeigte im Vergleich zu ihren Wildtyp-Kontrolltieren keinen Unterschied in den funktionellen und strukturellen Parametern der diabetischen Nierenschädigung. Dennoch führte A20-Defizienz zu einer verstärkten renalen Entzündungsreaktion und Fibrose. Es konnte allerdings keine Zunahme des renalen Zelluntergangs in diabetischen A20+/- Mäusen festgestellt werden.

Zusammenfassend ergab diese Arbeit Hinweise auf einen nephroprotektiven Effekt des Nekroptose-Effektormoleküls MLKL. Dieser scheint nicht auf einer verminderten Nekroptose, sondern auf einer reduzierten renalen Entzündungsreaktion in den Mlkl-defizienten Tieren zu beruhen. Auch die Untersuchung von diabetischen Mäusen ohne Ripk1- oder Ripk3-Kinaseaktivität ergab eine Reduktion einzelner renaler Entzündungsparameter, ohne jedoch den renalen Schaden zu beeinflussen. In ähnlicher Weise beeinflusste eine Defizienz des Nekroptose- und entzündungshemmenden A20-Moleküls nicht das Ausmaß des renalen Zelltods, führte aber in den A20-defizienten diabetischen Mäusen zu einer deutlich verstärkten renalen Inflammation und ausgeprägteren Fibrose. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit identifizieren MLKL und A20 damit als potenzielle Zielmoleküle pharmakologischer Therapiestrategien zur Progressionshemmung des diabetischen Nierenschadens.

Eine pathophysiologische Bedeutung der Nekroptose im Verlauf der diabetischen Nephropathie nach Streptozotocin-induziertem Diabetes konnte nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise ist in dem hier untersuchten diabetischen Nephropathie-Modell die renale Parenchymschädigung so gering, dass keine pathophysiologisch relevante Nekroptose im Beobachtungszeitraum bis Woche 27 induziert wird. Weiterführende Untersuchungen über einen längeren Beobachtungszeitraum oder die Verwendung von diabetischen Nephropathie-Modellen mit stärkerem Nierenschaden könnten den Beitrag der Nekroptose zur diabetischen Nierenschädigung genauer charakterisieren.

Abstract

Diabetic nephropathy as the most common underlying condition of end-stage renal failure represents a disease with high mortality and a high socio-economic burden. Chronic hyperglycemia causes renal damage with loss of excretory kidney function, injury of the filtration barrier as well as sclerosis and fibrosis of the organ tissue. Pathomechanisms, which have not yet been fully explored, include cell death which is associated with renal inflammation. This necroinflammation can be mediated by forms of regulated necrosis like necroptosis. Activated by different surface receptors expressed on the cell membrane, an intracellular signal transduction cascade involving the adapter molecules receptor-interacting protein kinase (RIPK) 1, RIPK3 and mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL) finally leads to rupture of the plasma membrane. This releases cell content into the extracellular space and triggers inflammation. A physiological negative regulator of necroinflammation is the intracellular anti-necroptotic and anti-inflammatory protein A20. By interacting with the RIPK1 and RIPK3 kinases it reduces necroptotic activity.

The aim of this work was to examine the contribution of necroinflammation to the progression of diabetic nephropathy in diabetic mice. For this, C57BL/6 wild-type mice and transgenic mice with inactivated kinase activities of RIPK1 or RIPK3 (Ripk1kd and Ripk3kd) as well as Mlkl-deficient knock-out mice (Mlkl-/-) were analyzed. In addition, heterozygous deficient A20+/- mice were used to study the inhibitory effect of A20. After unilateral nephrectomy to aggravate later kidney damage, diabetes mellitus was induced in the experimental animals by repeated intraperitoneal injections of streptozotocin. Mice were observed over a period of 25 to 27 weeks. At the end of the study, functional kidney parameters, morphological changes, renal cell death, and the extent of renal inflammation were determined and compared between experimental groups.

Results of the presented work show a successful establishment of the diabetic model following streptozotocin injections in all experimental groups. Within the first part of this work, a potential nephroprotective effect of Mlkl deficiency could be identified. Renal functional parameters (measured glomerular filtration rate, plasma urea levels, albuminuria) were not significantly different between diabetic wild-type and Ripk1kd-, Ripk3kd-, or Mlkl-/- mice. However, diabetic Mlkl-/- mice showed reduced hypoalbuminemia and hypercholesterolemia, indicating less damage to the glomerular filtration barrier in proteinuric renal disease. In addition, diabetic Mlkl-/- mice had significantly smaller glomeruli than wild-type mice, suggesting less glomerular damage and hyperfiltration. Renal cell death was not different between diabetic wild-type mice and the three transgenic mouse lines. However, significantly reduced glomerular infiltration of T cells and macrophages was evident in diabetic Mlkl-/- mice compared to wild-type. This correlated with reduced renal expression of inflammatory mediators including Tnf- α and Il-10, as well as the extracellular matrix protein laminin. In diabetic Ripk1kd- and Ripk3kd-mice tubulointerstitial macrophage infiltration and renal expression of some inflammatory mediators were reduced, but this did not correlate with reduced renal damage.

In the second part of this work, analysis of diabetic A20+/- mice revealed similar functional and morphological parameters of kidney injury compared to wild-type mice. Nevertheless, A20-deficient mice demonstrated increased renal inflammation and fibrosis. However, no increased rate of cell death could be demonstrated in diabetic A20+/- mice.

In summary, this work revealed a nephroprotective function of the necroptotic effector molecule MLKL. Apparently, this does not relate to ameliorated necroptosis, but to reduced renal inflammation in Mlkl-deficient animals. In addition, diabetic mice lacking kinase acitivity of RIPK1 or

RIPK3 showed reductions of some inflammatory markers in diabetic kidneys, but this did not affect renal outcomes. Similarly, deficiency of the anti-necroptotic and anti-inflammatory regulator A20 did not alter renal cell death, but significantly increased renal inflammation and fibrosis. Thus, the results of this work identify MLKL and A20 as potential targets for therapeutic interventions to reduce renal damage in progressive diabetic kidney disease.

A clear pathophysiological role for necroptosis in diabetic nephropathy of mice with streptocozininduced diabetes could not be established. In the investigated model of diabetic nephropathy, renal damage may be too mild to induce significant necroptosis contributing to renal injury within the 27 weeks of disease duration. Further experiments with a longer observational period or analysis of alternative models of diabetic nephropathy with more severe renal tissue injury are needed to fully explore the potential pathophysiological role of necroptosis in diabetic kidney disease.

1. Einleitung

1.1 Die chronische Nierenerkrankung

Chronische Nierenerkrankungen gehen mit einem exkretorischen sowie inkretorischen Funktionsverlust der Nieren einher.

Eine chronische Nierenerkrankung liegt gemäß Definition der internationalen nephrologischen Leitlinien-Organisation Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) aus dem Jahr 2013 vor, wenn bekannte strukturelle Veränderungen der Nieren z.B. in der Bildgebung vorliegen oder über mindestens 3 Monate eine renale Funktionseinschränkung besteht. Diese wird durch einen Abfall der glomerulären Filtrationsrate (GFR) unter 60 ml/min/1,73 m² und/oder durch den Nachweis einer pathologisch erhöhten Albuminausscheidung im Urin nachgewiesen (1).

In den Anfangsstadien ist die chronische Nierenerkrankung oftmals symptomlos. Die meist progrediente Erkrankung führt langfristig zur terminalen Niereninsuffizienz. Die exkretorische Funktion der Niere betreffend kommt es zu einer Störung des Wasser-, pH- und Elektrolythaushalts. Zudem können harnpflichtige Stoffe nicht ausgeschieden werden, wodurch eine Urämie entstehen kann. Bei zusätzlich ausfallender inkretorischer Nierenfunktion können eine renale Anämie und renale Osteopathie bei verminderter Produktion von Erythropoetin und reduzierter Aktivierung von Vitamin D auftreten.

1.1.1 Klinische Relevanz der chronischen Nierenerkrankung

Die globale Prävalenz der chronischen Nierenerkrankung liegt im Durchschnitt bei 13,4% (2). Allein in Deutschland sind in etwa 1,53 Millionen Menschen im Alter zwischen 18-79 Jahren von einer eingeschränkten Nierenfunktion betroffen, wobei eine deutliche Altersassoziation mit einem erhöhten Auftreten der chronischen Niereninsuffizienz vor allem im fortgeschrittenen Alter auffällig ist (2, 3).

Abhängig von der Restfunktion der Niere, gemessen anhand der GFR sowie dem Ausmaß der Albuminurie erfolgt die Stadieneinteilung der chronischen Niereninsuffizienz. Diese Stadien korrelieren mit der Prognose hinsichtlich weiterer Progression der Nierenfunktionsverschlechterung, aber auch mit dem Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen und Mortalität. Bei der terminalen Niereninsuffizienz, also im Stadium 5 (definiert als GFR < 15 ml/min/1,73 m²), steigt das Risiko urämischer Komplikationen, die den Beginn eines Nierenersatzverfahrens in Form einer chronischen Dialysebehandlung oder der Nierentransplantation erforderlich machen. Im Jahr 2006 wurden in Deutschland etwa 66.500 Patienten mit einem Nierenersatzverfahren versorgt, wobei dazu Patienten mit und ohne Nierentransplantation gezählt wurden (4). Nach den Angaben im Transplantationsregister finden jährlich etwa 2000 Nierentransplantationen statt. Im Zeitraum von 2006 bis 2016 ergaben dies insgesamt 28.475 Nierentransplantationen (5). Aufgrund des Mangels an Spenderorganen ist eine stetige Abnahme der Transplantationen zu verzeichnen. Bei einer Vielzahl an jährlichen Neuanmeldungen beträgt die durchschnittliche Wartezeit in Deutschland in der Regel mehrere Jahre. Zum Stichtag 31.12.2020 waren in Deutschland 11.903 Patienten auf der Warteliste zur Nierentransplantation registriert (6).

Die Mortalität der terminalen Niereninsuffizienz ist sehr hoch. Im Berichtsjahr 2006 verstarben in Deutschland 12.130 in Behandlung befindliche Patienten, global waren es 2017 bis zu 1,2 Millionen Menschen. Zudem steigt die Mortalität stetig (4, 7).

Für das Gesundheitssystem stellt die chronische Nierenerkrankung als eine der kostenintensivsten chronischen Erkrankungen (1) eine erhebliche Belastung dar. Die Kosten für die Versorgung von chronisch dialysepflichtigen Patienten beläuft sich jährlich auf rund 54.000 \in . Damit ergeben sich für die Krankenversicherungsträger Gesamtkosten von ca. 4,73 Milliarden Euro (8). Aber auch die geringeren jährlichen Kosten pro Patient für die Nachsorge nach Nierentransplantation liegen bereits bei ca. 11.000 \in (9). Während in den westlichen Ländern diese Verfahren zur Lebensverlängerung angewendet werden, ist der Zugang zu Nierenersatzverfahren in vielen weniger entwickelten Ländern nicht für alle betroffenen Patienten verfügbar, wodurch die Mortalität der chronischen Niereninsuffizienz in diesen Ländern in etwa doppelt so hoch ist (7).

Neben der finanziellen Belastung steigt bei Bestehen einer chronischen Nierenerkrankung zusätzlich das Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen. Unabhängig von klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Übergewichtigkeit, Dyslipidämie und der Diabetes erhöht die chronische Nierenerkrankung an sich das Risiko, kardiovaskuläre Erkrankungen zu erleiden. Darunter zählen Ereignisse wie Schlaganfälle, die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), koronare Herzerkrankungen, Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern. In vielen epidemiologischen Studien wurde nachgewiesen, dass eine erniedrigte GFR die kardiovaskuläre Mortalität um das Zwei- bis Dreifache steigert. Auch das Auftreten einer Mikroalbuminurie ist mit einer Verdoppelung der Mortalität verbunden. Diese Zusammenhänge sind unabhängig von Alter, Geschlecht oder ethnischer Herkunft (10).

1.1.2 Bedeutung der diabetischen Nephropathie

Eine Vielzahl an systemischen Erkrankungen wie auch renalen Ursachen führen zu einer chronischen Nierenerkrankung. Das häufigste Grundleiden, das mit einer terminalen Niereninsuffizienz assoziiert ist, stellte im Jahr 2006 laut Jahresbericht 2006/2007 der Quasi-Niere (Abbildung 1) der Diabetes mellitus (DM) mit 34% dar, wobei der Hauptanteil von 32% auf den DM Typ 2 und lediglich 2% auf den DM Typ 1 entfallen. Mit weitem Abstand folgen die hypertensiv-vaskuläre Nephropathie mit 23% und die Glomerulonephritiden mit 13%. Weitere Ursachen sind polyzystische und tubulointerstitielle Nierenerkrankungen, sowie hereditäre bzw. kongenitale Erkrankungen (4).



Abbildung 1: Diagnoseverteilung der Patienten bei Therapiebeginn der Dialysebehandlung (Inzidenz) im Jahr 2006 (4)

Im gleichen Jahr nahm die Diagnose diabetische Nephropathie mit 28% den Hauptanteil der Dialysepatienten ein. Mit der vaskulären Nephropathie, beides Erkrankungen, die vor allem im Alter auftreten, gewann die diabetische Nephropathie im Laufe der Jahre tendenziell immer mehr an Bedeutung (4) (Abbildung 2).



Abbildung 2: Diagnoseverteilung der Patienten bei Therapiebeginn der Dialysebehandlung (Inzidenz) im Jahresvergleich (4)

Oben genannte Daten verdeutlichen die bereits bestehende und stetig zunehmende sozioökonomische Belastung durch chronische Nierenerkrankungen, vor allem durch die diabetische Nephropathie. Somit kommt der Erforschung ihrer komplexen und bisher noch ungeklärten Pathomechanismen eine besondere Bedeutung zu. In Zukunft soll neben den lebensverlängernden Maßnahmen der Nierenersatztherapie im terminalen Stadium die Therapiemöglichkeiten erweitert werden. Es wird versucht, Behandlungsmethoden zu finden, die bereits frühzeitiger ansetzen, um das Entstehen und die Progression der Niereninsuffizienz bis zum terminalen Nierenversagen zu verhindern.

1.2 Physiologie der Niere

Die Nieren sind lebenswichtige Organe des menschlichen Körpers. Dass ihnen eine besondere Bedeutung zukommt, kann man bereits daran erkennen, dass sie als die besten durchbluteten Organe gelten. Während das Gewicht beider Nieren mit 300-600 g nur einen Bruchteil, nämlich 0,4% des menschlichen Körpergewichts ausmacht, fließt im Mittel etwa 1,2 L Blut in der Minute durch sie hindurch, was einem Anteil von 20% am Herzzeitvolumen entspricht. Diese dient nicht wie bei anderen Organen lediglich der metabolischen Versorgung, sondern ist notwendig für die vielen komplexen Funktionen der Niere. Dazu zählen die Filtrationsfunktion für die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen wie Harnstoff, Kreatinin, Harnsäure und toxische Stoffwechselprodukte, bei gleichzeitiger Konservierung wertvoller Blutbestandteile wie Glukose und Aminosäuren. Zudem regulieren die Nieren den Elektrolyt- und Wasserhaushalt sowie den Säure-Basen-Haushalt. Neben den exkretorischen Funktionen der Niere erfüllt sie zusätzlich inkretorische (endokrine) Aufgaben, sodass sie für die Regulation von Blutdruck und Blutvolumen mitverantwortlich ist, sowie durch die Hormonproduktion von Erythropoetin und Vitamin D auf die Blutbildung und den Knochenstoffwechsel Einfluss hat (11, 12).

Tabelle 1: Aufgaben der Niere modifiziert nach (11)

Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen, z.B. Harnstoff, Harnsäure, Kreatinin, toxischer Stoffwechselprodukte

Homöostase: Na⁺, extrazelluläres Volumen, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Phosphat, H⁺, HCO₃⁻ u.a.

Blutdruckregulation

Metabolismus: Proteine, Peptidhormon, Glukoneogenese, Toxine u.a.

Hormonbildung: Calcitriol, Erythropoetin, Renin (Enzym) -> Angiotensin

Hormonwirkungen: Antidiuretisches Hormon (ADH), Aldosteron, Adrenalin, atriales natriumretisches Peptid (ANP, ANF, Atriopeptin), Calcitriol, Parathyrin (PTH), Prostaglandine u.a.

Makroskopisch kann das Nierengewebe in eine etwa 1 cm dicke Nierenrinde (Kortex) und das Nierenmark (Medulla) unterteilt werden. Bei mikroskopischer Betrachtung wird jede Niere durch 1-1,5 Millionen Nephrone, welche die kleinste funktionelle Einheit der Niere darstellen, gebildet. Ein Nephron setzt sich zusammen aus dem Glomerulus (Nierenkörperchen) und seinem dazugehörigen nachgeschalteten Tubulussystem (11, 12).

Wie in Abbildung 3 dargestellt besteht das Glomerulus aus einem Knäuel aus ca. 30 sich aufzweigenden Blutkapillarschlingen, die sich aus der zum Nierenkörperchen zuführenden Arteriole, dem Vas afferens speisen und über das abführende Gefäß, dem Vas efferens drainiert werden. In den Glomeruli wird täglich durch Filtration ca. 180 L Primärharn gebildet. Dieses Ultrafiltrat wird in der Bowman-Kapsel, einem mit Epithel ausgekleidetem Raum, aufgefangen und an das Tubulussystem weitergeleitet. Die glomeruläre Kapillarwand stellt die Filtrationsbarriere dar, die sich aus drei Bestandteilen zusammensetzt. Das gefensterte Endothel lässt größere Moleküle passieren, hält jedoch zelluläre Blutbestandteile wie Erythrozyten im Kapillarlumen zurück. Die darunter befindliche Basalmembran und die außen aufsitzenden Podozyten verwehren größeren Molekülen den Durchtritt. Die Podozyten stellen spezialisierte epitheliale Zellen dar, deren Zellausstülpungen miteinander verzahnte Fußfortsätze bilden, die ihrerseits mit einer aus Nephrinmolekülen gebildeten Schlitzmembran verbunden sind. Zusätzlich können sie durch ihre eigene elektrische Ladung vor allem negativ geladene Moleküle abhalten. Durch diese Blut-Harn-Schranke können kleine Moleküle um die 5 kDa frei filtriert werden. Größere Moleküle über 70 kDa wiederum können die Filtrationsbarriere nicht durchgueren, sodass Moleküle wie Albumin mit 69 kD die Schranke nur schwer passieren (11, 12). Zur Beurteilung der Filtrationsfunktion der Niere wird die GFR bestimmt. Diese gibt das von den Glomeruli der Nieren filtrierte Plasmavolumen pro Zeiteinheit an. Der Normwert liegt abhängig vom Alter, Geschlecht und ethnischer Herkunft zwischen 90-120 ml/min/1,73 m² (13). Zur mechanischen Stabilisierung der Kapillarschlingen befinden sich Mesangiumzellen in und um die Glomeruli. Als weitere Funktionen besitzen sie phagozytotische Aktivität zur Entfernung von glomerulären Ablagerungen und sind Bestandteil des juxtaglomerulären Apparates zur Regulation des tubuloglomerulären Feedbacks als Mechanismus zur Anpassung der GFR an die Resorptionskapazität des Tubulussystems (11, 12).



Abbildung 3: Histologischer und feinstruktureller Aufbau des Glomerulus (11)

Über das Tubulussystem wird die Zusammensetzung des Primärharns abschnittsweise verändert, sodass aus dem initialem Ultrafiltrat ein Sekundärharn, also ein hochkonzentriertes Filtrat des Plasmas von etwa 1,5 L/Tag entsteht. In dem nach dem Glomerulus folgenden proximalen Tubulus findet der Hauptteil der Rückresorption, unter anderem von Glukose und Aminosäuren statt. In der darauffolgenden Henle-Schleife wird mit Hilfe aktiver Transportprozesse ein osmotischer Gradient aufgebaut, der von ca. 290 mosmol/L in der Nierenrinde bis zu 1300 mosmol/L im Nierenmark reicht und die Harnkonzentrierung im Gegenstromprinzip ermöglicht. Der anschließende distale Tubulus verläuft wieder zurück zum Glomerulus und bildet zusammen mit den glomerulusnah befindlichen Anteilen des Vas afferens und Vas efferens sowie der extraglomerulären Mesangiumzellen den juxtaglomerulären Apparat, welcher durch einen Feedbackmechanismus die GFR beeinflussen kann. Zuletzt gelangt der Harn zum Sammelrohr, wo unter Kontrolle von Aldosteron und antidiuretischem Hormon (ADH) die Harnkonzentrierung stattfindet (Abbildung 4). Im weiteren Verlauf wird dieser über die Papillen ins Nierenbecken geleitet und gelangt so zu den ableitenden Harnwegen (11, 12).



Abbildung 4: Nephron und Sammelrohrsystem (14)

1.3 Die diabetische Nephropathie

Die diabetische Nephropathie ist eine klinisch häufig gestellte Diagnose. Es kommt als Folge eines langzeitig erhöhten Blutzuckerspiegels zu einer chronischen Nierenerkrankung mit progredienter Schädigung und Funktionsverlust der Nieren. Als noduläre Glomerulosklerose oder Kimmelstiel-Wilson-Glomerulosklerose wird dabei das typische histologische Bild der glomerulären Vernarbung bezeichnet, die nach langjährig (schlecht eingestelltem) Diabetes mellitus Typ 1 auftritt.

1.3.1 Physiologie der Blutzucker-Regulation

Kohlenhydrate bilden neben Proteinen und Fetten die Hauptbestandteile unserer Ernährung und dienen als Energielieferant des Körpers. Unter den Kohlenhydraten stellt die Glukose den Hauptenergieträger dar, da viele Körperzellen diese direkt verstoffwechseln können. Abhängig von unserer Ernährung sowie dem Verbrauch kommt es zu tageszeitabhängigen Schwankungen des Blutzuckerspiegels. Damit der Blutzuckerwert eines Gesunden konstant bei 70-100 mg/dl liegt, ist die Regulation durch mehrere Hormone notwendig, hierunter unter anderem das Peptidhormon Insulin. Insulin wird in den ß-Zellen in den Langerhans-Inseln des Pankreas produziert und bei einem Anstieg des Blutzuckerspiegels ausgeschüttet. Die Wirkung des Insulins macht sich im Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsel bemerkbar, indem es anabole (aufbauenden) Prozesse verstärkt und gleichzeitig die katabolen (abbauenden) Vorgänge herabsetzt (Tabelle 2). Während Insulin als einziges Hormon für die Senkung des Blutzuckerspiegels verantwortlich ist, existieren neben Glukagon auch Katecholamine, Wachstumshormon und Kortisol als Gegenspieler, welche den Glukosewert im Blut anheben. Für die korrekte Regulation des Blutzuckers ist eine geregelte Balance zwischen den Antagonisten unerlässlich (15).

Insulinwirkung	Kohlenhydratstoffwechsel	Hemmung der Glukoneogenese und Glykogenolyse Förderung des Glukosetransports in die Zelle und der Glykogensynthese (v. a. in Leber und Muskel)
	Fettstoffwechsel	Hemmung der Lipolyse Förderung der Lipogenese (in Leber und Fettzellen)
	Proteinstoffwechsel	Hemmung der Proteolyse Förderung der Proteinsynthese (positiver Stickstoffwechsel)
Auswirkungen bei Insulin- mangel	Kohlenhydratstoffwechsel	gesteigerte Glukoneogenese und Glykogenolyse (um die durch den Insulinmangel fehlende Glukose in den Zellen bereitzustellen) reduzierte Glukoseaufnahme in die Zellen (→ Hyperglykämie)
	Fettstoffwechsel	gesteigerte Lipolyse (mit Bildung von Ketonkörpern \rightarrow Ketoazidose)
	Proteinstoffwechsel	gesteigerte Proteolyse

Tabelle 2: Insulinwirkung a	If den Stoffwechsel nach ((15)
-----------------------------	----------------------------	------

1.3.2 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus, im Volksmund als Zuckerkrankheit bezeichnet, ist eine Gruppe metabolischer Erkrankungen mit dem gemeinsamen Merkmal einer chronischen Hyperglykämie. Die Kriterien zur Diagnosestellung sind entweder ein Nüchtern-Glukosewert von \geq 126 mg/dl, ein HbA1c \geq 6,5% oder ein Blutzuckerwert von \geq 200 mg/dl bei einem oralen Glukosetoleranztest mit Messung nach zwei Stunden (16).

Die Klassifizierung durch die American Diabetes Association (ADA) sowie die World Health Organization (WHO) unterteilt die Erkrankung in vier Gruppen. Der Diabetes mellitus Typ 1 ist eine Autoimmunerkrankung, welche vor allem bei jungen Patienten zwischen etwa 12-24 Jahren erstmalig auftritt - häufig nach einem fieberhaften Infekt oder auch als Coma diabeticum möglich. Hierbei führt ein autoimmunvermittelter progredienter Untergang der insulinproduzierenden ß-Zellen der Langerhans-Inseln im Pankreas zu einem absoluten Insulinmangel. Ab einer Zerstörung von 80% der ß-Zellen kommt es zu einer Erhöhung des Blutzuckers (17). Der Typ 1 Diabetes ist assoziiert mit weiteren Erkrankungen im autoimmunen Formenkreis wie die Hashimoto Thyreoiditis, Zöliakie oder M. Addison (15, 16, 18).

Die zweite Gruppe, der Diabetes mellitus Typ 2, nimmt mit etwa 90% den größten Anteil aller Diabetesformen ein. Diese Form manifestiert sich meist erst in späteren Lebensjahren (> 40 Jahren) und hat als Ursache eine periphere Insulinresistenz. Eine langfristig erhöhte Kalorienzufuhr führt anfangs zu einer gesteigerten Insulinsekretion. Hält der hohe Insulinspiegel über eine lange

Zeit an, erfolgt ein Herabregulieren der Sensibilität und Dichte der Insulinrezeptoren im peripheren Gewebe. Dadurch wird die Glukoseaufnahme in die Muskel- und Fettzellen verringert, bei gleichzeitigem Anstieg der Blutglukosewerte. Zusätzlich fällt die anabole Wirkung des Insulins sowie Hemmung der katabolen Wirkung seiner Antagonisten weg. Der Typ 2-Diabetes ist assoziiert mit dem metabolischen Syndrom, einem gemeinsamen Auftreten der folgenden Symptome: Abdominelle Adipositas, Dyslipoproteinämie, Hypertonie, Hyperglykämie. Die Diagnose der schleichend verlaufenden Erkrankung wird nicht selten als Zufallsbefund gestellt. Neben unspezifischen Symptomen wie eine Leistungsminderung oder Müdigkeit kann auch eine Polyurie und Polydipsie durch die osmotische Diurese bei vermehrter renaler Glukoseausscheidung, Sehstörungen, Wadenkrämpfe und Pruritus auftreten (15, 16, 18).

Zudem bestehen weitere spezifische Diabetestypen durch Pankreaserkrankungen, Endokrinopathien, medikamentös-toxische Fremdstoffe, Infekte und infolge genetischer Ursachen. Diese werden als Diabetes Typ 3 zusammengefasst. Eine eigene vierte Gruppe bildet der Gestationsdiabetes (15, 16, 18).

Der mehrheitlich durch Überernährung und Bewegungsmangel entstehende Typ 2-Diabetes als dominierende Form des Diabetes mellitus gilt vor allem in westlichen Ländern als Wohlstandserkrankung. Als Volkskrankheit hat er in Deutschland eine Prävalenz von etwa 10%, mit einer Häufung vor allem im Alter (19, 20).

Die anfangs symptomlose Erkrankung wird zumeist spät erkannt und diagnostiziert. Zusätzlich erfordert die Behandlung, welche aus einer Kombination von Lebensstiländerung, oralen sowie subkutan zu applizierenden Medikamenten und/oder einer Insulin-Substitution besteht, eine hohe Therapieadhärenz des Patienten. Dies führt nicht selten zu einer unzureichenden Blutzuckereinstellung, was im Langzeitverlauf das Risiko für Organschäden steigert. Durch den chronisch erhöhten Blutzucker kann eine Makroangiopathie mit arteriosklerotischen Veränderungen großer Blutgefäße und somit kardiovaskuläre Ereignisse wie Myokardinfarkt, Schlaganfall oder periphere arterielle Verschlusskrankheit hervorgerufen werden. Zudem kann sich durch die langfristige Hyperglykämie (nach 5-10 Jahren) eine Schädigung kleiner Blutgefäße, eine Mikroangiopathie mit Endorganschädigung, entwickeln. Abhängig davon, welches Organ betroffen ist, tritt eine diabetische Nephropathie, Retinopathie oder Neuropathie auf (15, 18).

1.3.3 Renale Auswirkungen der Hyperglykämie

Bereits im Altertum gibt es Überlieferungen vom Auftreten der diabetischen Erkrankung. Dabei wird im alten Ägypten und Indien vor allem von einer Polyurie sowie von einem süßen Urin berichtet, welcher bis heute namensgebend für die Erkrankung ist. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass Galen im 2. Jahrhundert den Diabetes mellitus als eine Erkrankung der Nieren postulierte. Lange hielt dieser Gedanke an, bis zum Ende des 19. Jahrhunderts, als schließlich das Pankreasgewebe und das dort produzierte Insulin mit dieser Erkrankung in Verbindung gebracht wurde (21).

Heute wird der Diabetes zur Gruppe der Stoffwechselerkrankungen gezählt. Dennoch stellt die renale Schädigung durch die Hyperglykämie weiterhin eine wichtige Komplikation der Erkrankung dar. Rund 15% der Typ 1- und ca. 10% der Typ 2-Diabetiker entwickeln im Verlauf eine diabetische Nephropathie (18). Nicht selten wird bei Typ 2-Diabetikern erst nach Auftreten von renalen Symptomen die Diagnose der ansonsten initial symptomarmen Erkrankung gestellt. Die Schwere der Nierenschädigung ist abhängig vom Ausmaß und der Dauer der Hyperglykämie, sowie be-

gleitende Risikofaktoren wie Hypertonie, Dyslipidämie, Zigarettenrauch, einigen genetischen Polymorphismen des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und anderen genetischen Faktoren (22). Vor allem bei Typ 1-Diabetiker hat das Auftreten einer diabetischen Nephropathie bedeutende Auswirkungen auf die Überlebensprognose (23), erhöht jedoch auch bei Typ 2-Diabetikern die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität (24).

Pathophysiologisch betrachtet tragen viele Mechanismen zur diabetischen Nierenschädigung bei (Abbildung 5). Zum einen kommt es durch hämodynamische Veränderungen zu einer glomerulären Hyperfiltration. Das Überangebot an vermehrt filtrierter Glukose im tubulären System steigert die Aktivität des Natrium-Glukose-Transporters 2 (SGLT 2) im proximalen Tubulus, wodurch sowohl Glukose als auch Natrium vermehrt rückresorbiert werden. Die verminderte Natriumchloridkonzentration im nachfolgenden distalen Tubulus aktiviert an der Macula densa den tubuloglomerulären Feedback im juxtaglomerulären Apparat, was zu einer Vasodilatation im Vas afferens bei gleichzeitiger Vasokonstriktion des Vas efferens führt. Zusätzlich bewirkt die Hyperglykämie eine Ausschüttung von vasodilatierenden Mediatoren wie Insulin-like growth factor 1 (IGF-1), Glucagon, Stickstoffmonoxid (NO), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Prostaglandine, die allesamt die Erweiterung des Vas afferens weiter verstärken. Auch die durch endotheliale Schäden vermehrte Ausschüttung von Endothelin 1 mündet in eine vaskuläre Dysfunktion. Die Folge der glomerulären Hyperfiltration ist eine Hypertrophie der Glomeruli, eine Podozytenschädigung und schließlich eine Sklerosierung der Glomeruli (25, 26).

Eine Folge der renalen Mikroangiopathie ist das reduzierte Angebot an Sauerstoff für das Nierengewebe. Freie Radikale werden freigesetzt und schädigen vor allem das schlechter versorgte Nierenmark. Neben der Hypoxie führt auch die Hyperglykämie an sich zu zellulärem Stress und Dysfunktion. Es folgt eine proinflammatorische Reaktion, bei der Chemokine, Zelladhäsionsmoleküle und Danger Associated Molecular Patterns (DAMPs) freigesetzt werden, welche Leukozyten, beispielsweise Makrophagen inflammatorisch aktivieren. Die zusätzlich bei chronischer Hyperglykämie durch Glykierung, also nichtenzymatische Reaktion mit Kohlenhydraten entstehenden Advanced Glycation Endproducts (AGEs) und oxidierte Lipoproteine führen zu einer Adhäsion und Diapedese von Leukozyten und Mastzellen. Die Reaktion des Immunsystems führt zu einer Inflammation und weiterer Schädigung der Niere mit einer tubulointerstitiellen Fibrosierung und Untergang der Nierentubuli (25-29).

Nicht zuletzt spielt auch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) eine wichtige Rolle bei der Entstehung der diabetischen Nephropathie (Abbildung 5). Aktiviert wird das RAAS durch die Hyperglykämie, die durch vermehrte tubuläre Resorption erniedrigte Salzkonzentration an der Macula densa, sowie durch AGEs. Eine Überaktivierung dieser Hormonachse führt zu einer Vasokonstriktion im Vas efferens der Glomeruli und Verstärkung der glomerulären Hyperfiltration, was zunehmende glomeruläre Schäden verursacht. Ein erhöhter glomerulärer Filtrationsdruck führt darüber hinaus zu einer gesteigerten Proteinurie. Eine persistierende Proteinurie und Albuminurie wiederum gilt als Stressfaktor für Tubuluszellen, die vermehrt Zytokine und weitere Entzündungsmediatoren produzieren. Diese tubuläre Schädigung führt daher zu einer tubulointerstitiellen Entzündung mit fortschreitender Fibrosierung des Nierenparenchyms, was zur Progression der diabetischen Nephropathie beiträgt. Daher beinhaltet die Therapie der diabetischen Nephropathie eine Behandlung mit den nephroprotektiv wirkenden Angiotensin Converting Enzyme (ACE)-Inhibitoren oder Angiotensin I (AT1)-Rezeptor-Blockern. Neben der Blutdrucksenkung wird die Wirkung von Angiotensin II auf die efferenten glomerulären Arteriolen blockiert, mit Reduktion des glomerulären Filtrationsdrucks, der damit einhergehenden Hyperfiltration und der

Proteinurie. Mit der zusätzlich reduzierten Produktion von inflammatorischen Mediatoren wird insgesamt die glomeruläre und tubuläre Schädigung vermindert und eine Progression der diabetischen Nephropathie verlangsamt (25, 26, 30-32).



Abbildung 5: Pathophysiologie der Diabetischen Nephropathie, modifiziert nach (26)

1.3.4 Pathologie

Auf histologischer Ebene präsentiert sich die diabetische Nierenschädigung vaskulär mit einer Hyalinisierung der zu- und abführenden glomerulären Arteriolen, sowie einer mikroangiopathisch bedingten arteriosklerotischen Veränderung der kleinen renalen Blutgefäße. In den Glomeruli entwickelt sich eine Hypertrophie sowie mesangiale Matrixausdehnung. Im Verlauf tritt eine noduläre Sklerosierung auf, die beim Typ 1-Diabetiker klassisch auch als Kimmelstiel-Wilson-Läsion bezeichnet wird, sich aber auch bei Typ 2-Diabetes als knötchenförmige Vernarbung (fokale Glomerulosklerose) entwickelt. Die glomeruläre Filtrationsbarriere wird beschädigt durch eine Verdickung der Basalmembran sowie einer Hypertrophie und Untergang der Podozyten (21). Im tubulären Kompartiment erfolgt eine tubulointerstitielle Fibrosierung und tubuläre Atrophie. Darüber hinaus kommt es zu einer Rarifizierung von Kapillaren und aufgrund des Entzündungsgeschehens treten vermehrt Entzündungszellen auf (21, 33) (Abbildung 6).



Abbildung 6: Pathologische Läsionen bei der diabetischen Nephropathie (33)

Entsprechend der auftretenden pathophysiologischen und histologischen Veränderungen lassen sich die funktionellen Störungen der diabetischen Nephropathie erklären (Abbildung 7).

Die initiale, hämodynamisch bedingte glomeruläre Hyperfiltration (Erhöhung der GFR um 20-50%) nimmt im Verlauf der Erkrankung mit zunehmender Vernarbung der Niere immer weiter ab. Zur Abschätzung der noch bestehenden Filtrationsleistung der Nieren und für die Stadieneinteilung der chronischen Nierenerkrankung, sowie zu ihrer Verlaufskontrolle dient die Bestimmung der GFR. In der Endphase steht hierbei eine terminale Niereninsuffizienz mit fortgeschrittenem renalem Funktionsverlust und der Notwendigkeit zur Einleitung eines therapeutischen Nierenersatzverfahrens (25, 26).

Die Läsion der glomerulären Filtrationsbarriere bedingt eine gesteigerte Durchlässigkeit von größeren Molekülen und Proteinen, die normalerweise bei gesunden Menschen die Blut-Harn-Schranke nicht passieren können. Eine Mikroalbuminurie (30–300 mg/d) ist im initialen Stadium der diabetischen Nephropathie die Folge und kann daher als Frühmarker der Erkrankung genutzt werden. Bei Progredienz der Erkrankung entwickelt sich diese zu einer Makroalbuminurie (> 300 mg/d). Das Auftreten eines nephrotischen Syndroms, einhergehend mit einer großen Proteinurie (>3,5 g/d), peripheren Ödemen, Hypoalbuminämie und Hyperlipoproteinämie kann dem folgen (18, 25, 26).

Durch die Aktivierung des RAAS wird der Blutdruck erhöht. Die initial mäßige Hypertonie verschlechtert sich über Jahre hinweg (25, 26).



Abbildung 7: Renale Veränderungen beim Diabetes mellitus Typ 1 (26)

1.4 Die Nekroptose

1.4.1 Formen des Zelluntergangs

Der Zelltod beschreibt ein irreversibles Aussetzen des Stoffwechsels durch entweder eine Fragmentierung der Zelle samt Nukleus, eine Einverleibung des Zellkörpers bzw. seiner Zellfragmente durch benachbarte Zellen oder bei Erlöschen seiner morphologischen Integrität (34). Dem Zelluntergang können verschiedene Prozesse zugrunde liegen. Gründe für das Absterben der Zellen liegen zum einen in der Erneuerung und dem Ersetzen von überalterten Zellen, wobei ein Gleichgewicht zwischen Zellwachstum und Zelltod herrschen muss, um die Zellzahl eines Organismus in etwa beibehalten zu können. Des Weiteren dient er zum Ersetzen von durch äußere Einwirkungen beschädigter Zellen (35). Zu den bekanntesten Zelluntergangsformen zählen die Apoptose und die Nekrose (34, 36).

Die Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, gilt als die physiologische und kontrollierte Form des Zelluntergangs. Genetisch vorprogrammiert, kommt es zu einem streng regulierten, energieverbrauchenden Absterben der Zelle unter Adenosintriphosphat (ATP)-Konsum. Es wird zwischen zwei Wegen zur Aktivierung der Apoptose unterschieden. Der intrinsische Weg verläuft über die pro- und antiapoptotisch wirkenden Proteine der B-cell Lymphoma 2 (BCL-2)-Familie. Bei Zellschädigung, Anstieg von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), Auftreten von DNA-Schäden oder einem Wegfall von Wachstumsfaktoren überwiegen die proapoptotischen Proteine und es werden die Proteine Bcl-2-Associated X Protein (BAX) und Bcl-2 Homologous Antagonist Killer (BAK) aktiviert, welche Poren in die mitochondriale Membran einbauen. Das Cytochrom C, welches als ein Bestandteil der Atmungskette an der inneren Mitochondrienmembran sitzt, wird in das Zytosol freigesetzt und aktiviert über die Caspase 9 die Caspasekaskade, welche zur Apoptose führt. Aufgrund der besonderen Bedeutung der Mitochondrien wird dieser Mechanismus auch als mitochondrialer Weg bezeichnet. Der extrinsische Weg wiederum verläuft über Aktivierung von an der Zelloberfläche befindlichen Todesdomän (Death Domain)-Rezeptoren, einer Gruppe von zur Familie der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Rezeptoren (TNFR) gehörender Mitglieder wie TNFR1 oder Fas-Rezeptor. Durch Bindung von Liganden wie TNF- α an den Rezeptor wird eine intrazelluläre Signalkaskade angestoßen, welche letztendlich über Caspase 8 die

Apoptose einleitet. Bei der Apoptose kommt es zu einem Zerfall des Zellkerns durch die Karyopyknose, einer Verschrumpfung und Verdichtung des Kernmaterials, sowie der folgenden Karyorrhexis, der den endgültigen Zerfall und Fragmentierung des Zellkerns beschreibt. Zudem wird das Zytoskelett abgebaut. Beide Vorgänge führen zu einer Zellschrumpfung bei erhaltener Zellmembran. Die Zelle zerfällt in einzelne Fragmente ohne eine deutliche Entzündungsreaktion auszulösen. Später werden diese Fragmente, welche auch als Apoptosekörperchen bezeichnet werden, durch Phagozytose von Makrophagen abgebaut, ohne diese inflammatorisch zu aktivieren (37-39).

Dem gegenüber steht als Form des unregulierten Zelltods die Nekrose. Im Rahmen von Zellstress, ausgelöst durch mechanische Verletzung, Hypoxie, Toxine, Hyper-/Hypothermie oder Krankheitserreger wird die Funktionsfähigkeit der Zelle zerstört. Die Zellschädigung führt zu einer irreversiblen Stoffwechselstörung und einem gestörten Flüssigkeits- und Ionenhaushalt. Als Folge schwillt die Zelle, wie auch seine intrazellulär befindlichen Organellen an. Davon betroffen sind unter anderem auch die Lysosomen, bei denen durch das starke Anschwellen die Plasmamembran rupturiert. Es treten die innerhalb der Lysosomen befindlichen abbauenden Enzyme in das Zytosol über, was die Zelle weiter schädigt. Den Zellkern betreffend erfolgt eine Karyolyse. Durch Zerfall und Abbau der DNA schrumpft der Zellkern immer weiter, bis er sich vollständig auflöst. Die zunehmende Schwellung der Zelle führt letztendlich auch zur Ruptur der äußeren Zellmembran. Zellbestandteile gelangen in den extrazellulären Raum und lösen eine Entzündungsreaktion aus, wobei die Zellen des angeborenen Immunsystems aktiviert werden. Die Nekrose tritt bevorzugt bei größerem Zellschaden und bei einem ATP-Mangel auf, da in diesen Fällen keine Apoptose ablaufen kann (37, 38) (Abbildung 8).



Abbildung 8: Morphologische Merkmale der Apoptose und Nekroptose (40)

Anfänglich wurde davon ausgegangen, dass der Zelltod nur auf einem der beiden sehr unterschiedlichen Wegen ablaufen kann, und dieser somit entweder auf der kontrollierten Form der Apoptose oder der unprogrammierten Form der Nekrose basiert. Heute geht man davon aus, dass diese vielmehr zwei Extreme eines Kontinuums darstellen. Abhängig von den Ausgangsbedingungen (Grad des Zellschadens, Vorhandensein von ATP, Gewebetyp) überwiegt eher die eine oder die andere Form des Zelluntergangs (38). Darüber hinaus wurden zunehmend Formen des Zelltods entdeckt, die teilweise die zellbiologische Regulation der bekannteren Zelluntergangsformen teilen oder denen weitere Mechanismen zugrunde liegen. Zu ihnen gehören die Nekroptose, Pyroptose, Ferroptose, die Mitochondrial Permeability Transition (MPT)-ausgelöste Nekrose und der Lysosomen-abhängige und Autophagie-abhängige Zelltod (39, 41).

1.4.2 Überblick über die Signaltransduktion

Wie der Name es schon vermuten lässt, ist die Nekroptose eine Zelltodform, die sowohl Aspekte der Nekrose wie auch der Apoptose beinhaltet. Morphologisch ähnelt sie der Nekrose. Bei der Nekroptose kommt es durch Porenbildung zu einer nekroseähnlichen Ruptur der Plasmamembran, bei der Zellinhalt in den extrazellulären Raum gelangt. Die damit verbundene Freisetzung von DAMPs bewirkt eine Entzündungsreaktion, welche auch die umliegenden Zellen beschädigt. Die Aktivierung und die Signaltransduktion ähnelt eher der Apoptose, da sie zellbiologisch reguliert abläuft. Sie ähnelt dem extrinsischen Weg der Apoptose. Während bei der Apoptose die Caspasen eine zentrale Rolle spielen, sind bei der Nekroptose vor allem das Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein (MLKL) sowie die beiden intrazellulären Kinasen Receptor-Interacting Serine/Threonine Protein Kinase 1 (RIPK1) und RIPK3 von großer Bedeutung. Aufgrund ihrer Eigenschaften gehört die Nekroptose auch zu den `regulierten Nekroseformen´ (42) oder des `Caspase unabhängigen programmierten Zelltods´ (43).

Die Nekroptose tritt vor allem bei Zellstress auf, doch sie hat daneben auch eine Funktion zum Schutz des Organismus in der Entwicklung (z.B. durch Eliminierung potenziell defekter Zellen vor der Geburt) und in der Aufrechterhaltung der Homöostase reifer T-Zellen (39). Pathophysiologisch spielt die Nekroptose bei einer Reihe von Erkrankungen den gesamten menschlichen Organismus betreffend eine wichtige Rolle (Abbildung 9). So tritt sie im Rahmen von kardiovaskulären (44, 45), neurologischen (46-49), pulmonalen (50, 51), gastrointestinalen (52, 53) und renalen Erkrankungen (54-56) auf, zudem auch bei Autoimmunerkrankungen, Infektionen und nach Organtransplantationen (57).



Abbildung 9: Zentrale Rolle der Nekroptose bei Erkrankungen des Menschen (58)

Die Nekroptose (Abbildung 10) wird durch Aktivierung unterschiedlicher auf der Zellmembran exprimierter Rezeptoren ausgelöst. Neben anderen gehören hierzu die Todesdomän-Rezeptoren TNFR1 und FAS-Rezeptor, die zur Gruppe der Pattern-Recognition Rezeptoren (PRRs) gehörenden Toll-like Rezeptoren 3 (TLR3) und TLR4, sowie der Interferon- α/β -Rezeptor (IFNAR). Unter diesen Rezeptoren ist der Mechanismus der TNFR1-vermittelten Nekroptose am besten erforscht, weshalb im Folgenden die Signaltransduktion der TNFR1-induzierten Nekroptose näher erläutert wird.

Nach extrazellulärer Bindung von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) an seinen Rezeptor TNFR1 wird intrazellulär die Bildung eines Multiprotein-Rezeptorkomplexes aus RIPK1, dem Adapterprotein TNFR Type 1-Associated Death Domain (TRADD) sowie den weiteren Proteinen TNFR-Associated Factor 2 (TRAF2), TRAF5, dem Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1 (cIAP1) und cIAP2 induziert. Im ubiquitinierten Zustand von RIPK1 vermittelt dieser Rezeptorkomplex, auch Komplex I oder Prosurvival-Komplex genannt, über Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors Nuclear Factor Kappa Light Chain- Enhancer of Activated B-Cells (NF-κB) das Überleben der Zelle. Ist RIPK1 aufgrund Aktivität der Ubiquitin-Carboxyl-Terminale Hydrolase (CYLD) jedoch im deubiquitinierten Zustand führt der Multiproteinkomplex, nun aus TRADD, dem Fas-Rezeptor-assoziierten Death Domain (FADD)-Protein, RIPK1 und zusätzlich gebundener aktiver Caspase 8 bestehend (auch Komplex IIa genannt), zur Apoptose (59, 60). Erst durch die Abwesenheit oder Hemmung von Caspase 8 durch Cellular FLICE-Like Inhibitory Protein (cFLIP) (61) und der Präsenz von im weiteren Verlauf phosphorylierter RIPK3 kann der Rezeptorkomplex Nekroptose induzieren und wird entsprechend als Komplex IIb oder Nekrosom bezeichnet (59, 60). Obgleich das Enzym RIPK1 eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion spielt, konnte gezeigt werden, dass trotz der Abwesenheit von RIPK1 über alternative Wege RIPK3 aktiviert und die Nekroptose eingeleitet werden kann (59, 60, 62, 63).

Die phosphorylierte Proteinkinase RIPK3 phosphoryliert selbst im nächsten Schritt das Protein MLKL, was eine Schlüsselrolle in dem Signalweg der Nekroptose spielt. Die MLKL-Monomere bilden durch Oligomerisierung einen Porenkomplex, welcher in die Plasmamembran eingebaut wird. Dadurch kann intrazellulär befindliches Zellmaterial, unter anderem DAMPs nach außen austreten und eine Entzündungsreaktion hervorrufen. Darüber hinaus rekrutieren die MLKL-Oligomere zusätzlich den Einbau von Natrium- oder Kalziumkanäle in die Plasmamembran, wodurch eine Ruptur der Zellmembran induziert wird. Es wird davon ausgegangen, dass RIPK3 noch weitere Funktionen in der Signaltransduktion der Nekroptose einnimmt, unter anderem durch Assoziation mit PGAM, einem mitochondrialen Molekül, das zur Öffnung des Mitochondrial Permeability Transition Pore (mPTP) Komplexes führt. Die steht nach heutigem Stand der Kenntnisse allerdings noch in Diskussion (57, 59).

Neben dem beschriebenen extrinsischen Weg der Nekroptose über den an der Zellmembran befindlichen Rezeptoren kann die Aktivierung dieser Zelltodform zudem über einen intrinsischen Mechanismus durch ROS erfolgen oder durch Ischämie induziert werden (59).





(A) Gesamtschema der Rezeptoren und intrazellulären Signaltransduktionskomponenten, welche bei der Bindung an ihre Liganden die Nekroptose aktivieren. Die Rezeptoren umfassen die TNF-Rezeptor-Superfamilie (TNFR1 und Fas/CD95), die Toll-like-Rezeptor-Superfamilie (TLR3/4) und den Interferon-Rezeptor (IFNR). (B) Signaltransduktionsereignisse nachgeschaltet an TNFR1. Die Aktivierung des TNFR1 durch die Bindung von TNF- α kann die Bildung eines Zellüberleben fördernden Komplexes (Komplex I) auslösen, der die Rezeptor-interagierende Proteinkinase-1 (RIPK1) enthält. Wenn Komplex I ubiquitiniert wird, führt dies zu einem NF-kB-vermittelten Überleben. Alternativ kann die De-Ubiquitinierung von RIPK1 entweder durch die Ubiquitin-Carboxyl-terminale Hydolase (CYLD) oder durch ein pharmakologisches Targeting von zellulären Inhibitoren der Apoptose (cIAPs) den Komplex IIa aktivieren. Komplex IIa ist ein Proteinensemble, das aus TNFR1-assoziiertem Todesdomänenprotein (TRADD), Fas-assoziiertem Protein mit Todesdomäne (FADD) und RIPK1 besteht. In Gegenwart von Caspase 8 neigt Komplex II vorzugsweise in Richtung IIa, was zu Apoptose führt. In Abwesenheit von Caspase 8 und Anwesenheit von RIPK3 wechselt Komplex II jedoch zu IIb, das pronekroptotisch ist. Der Komplex IIb führt dann über die Phosphorylierung der domänenähnlichen Pseudokinase (MLKL) durch RIPK3 oder durch Assoziation des Phosphoglyceratmutase-Familienmitglieds (PGAM)-5 mit RIPK3 zur Nekroptose, was die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Übergangsporenkomplexes (mPTPs) verursacht.

1.4.3 Intrazelluläre Proteine der Signaltransduktionskaskade

RIPK1

RIPK1 ist ein intrazelluläres Enzym, das zur Familie der Rezeptor-interagierenden Proteinkinasen gehört. Von seinen insgesamt 7 Mitgliedern (64) wurde RIPK1 als erstes seiner Familie 1995 aufgrund seiner Wechselwirkung mit dem FAS-Rezeptor in Hefezellen entdeckt (65). Es besteht aus 671 Aminosäuren (66), hat eine Größe von etwa 76 kDa (67) und ist auf dem RIPK1-Gen auf Chromosom 6 kodiert (68). RIPK1 dient als regulatorische Schnittstelle bei Auftreten von zellulärem Stress. Für seine vielen Funktionen besitzt das Enzym mehrere Domänen (Abbildung 11), um unterschiedliche Signalwege induzieren zu können: eine N-terminale Serin/Threonin-Kinase Domäne (KD), eine Intermediärdomäne (ID) und eine C-terminale Todesdomäne (Death Domain, DD) (69). Durch eine aktive KD kann eine Autophosphorylierung von RIPK1 erfolgen. Diese ist für die Einleitung der Signalwege sowohl der Apoptose wie auch der Nekroptose notwendig (70). Die ID beinhaltet unter anderem die RHIM-Domäne, an die sich RIPK3 und andere Proteine, welche ebenfalls eine RHIM-Domäne besitzen, wie TIR Domain-Containing Adaptor-Inducing Interferon-β (TRIF) und DNA-Dependent Activator of Interferon-Regulatory Factor (DAI), binden können. Eine Reihe weiterer Proteine kann unabhängig der RHIM-Domäne an die ID binden. Die DD bindet an die Todesrezeptoren (DR) wie TNFR-1 oder FAS-Rezeptor, wie auch die Adapterproteine TRADD und FADD, sowie die Caspase 8 und dient damit der Aktivierung sowohl des prosurvival NF-κB Signalwegs, der Caspase-abhängigen Apoptose und der RIPK-abhängigen Nekroptose (64, 66, 69).

RIPK3

RIPK3, wie RIPK1 zur Rezeptor-interagierenden Proteinkinase-Familie gehörend, besteht aus 518 Aminosäuren, wovon etwa die Hälfte ihrer Aminosäurensequenz mit der von RIPK1 identisch ist (66). Die Kodierung des 1999 entdeckten Enzyms (71, 72) erfolgt auf dem RIPK3-Gen auf Chromosom 14 (73). Das etwas kleinere Molekül (Abbildung 11) besteht aus einer Serin/Threonin-Kinase-Domäne (KD) und einer Intermediärdomäne (ID), dessen C-terminales Ende von der RHIM-Domäne gebildet wird. Im Gegensatz zu RIPK1 fehlt hier eine Todesdomäne. Eine besondere Rolle für die Einleitung der Nekroptose spielt die KD. Durch Phosphorylierung über RIPK1 und Autophosphorylierung wird die Pseudokinase MLKL rekrutiert. Im weiteren Schritt wird MLKL selbst durch RIPK3 phosphoryliert und aktiviert. Die RHIM-Domäne innerhalb der ID dient zur Bindung von RIPK1 mit RIPK3 und somit zur Formierung des Nekrosoms (66, 69).

Die Aktivierung von RIPK3 kann auch auf anderen Wegen erfolgen. So konnte gezeigt werden, dass die Nekroptose auch RIPK1 unabhängig eingeleitet werden kann (59, 62, 63, 74). Beispielsweise kann die Bindung von RIPK3 mit anderen Proteinen, die ebenfalls eine RHIM-Untereinheit besitzen wie TRIF oder DAI zur RIPK3-abhängigen programmierten Nekrose führen (75). Zudem wird RIPK3 auch eine Rolle bei der Bildung von Poren in der mitochondrialen Membran durch mPTPs anhand Wechselwirkung mit Phosphoglyceratmutase (PGAM)-5 zugesprochen. Dieser ebenfalls zum Zelltod führende Signalweg wird bis heute allerdings kontrovers diskutiert, da in anderen Studien gezeigt werden konnte, dass die Nekroptose selbst bei einer Depletion von Mitochondrien nicht beeinflusst wird (57, 59, 76).



Abbildung 11: Funktionelle Domänen und Tertiärstruktur von RIPK1 und RIPK3 (66)

MLKL

MLKL ist eine Pseudokinase, das heißt ein Enzym-artiges Protein ohne Enzymaktivität. Von den über 500 Proteinkinasen im menschlichen Genom werden etwa 10% zu der Gruppe der Pseudokinasen gezählt. Während eine aktive Kinase aus drei wesentlichen Untereinheiten (VAIK, HRD und DFG) besteht, fehlt dem MLKL-Protein zwei der drei Untereinheiten, wodurch es enzymatisch inaktiv ist und keine Phosphorylierung durchführen kann (77, 78). Kodiert ist das MLKL-Gen auf Chromosom 16 (79). MLKL besteht N-terminal aus einem Four Helix Bundle (4HB) und einer C-terminalen Pseudokinasedomäne, wobei beide Enden durch eine Zwei-Helix-Klammer verbunden sind. Die Phosphorylierung durch RIPK3 erfolgt in der Pseudokinasedomäne, wodurch sich die Konformation dieser Domäne ändert und die 4HB-Domäne freigelegt wird. Mit Hilfe von Disulfidbrücken findet eine Oligomerisierung von MLKL-Monomeren statt, darüber hinaus wird eine Membrantranslokation eingeleitet. Die genaueren weiteren Mechanismen im Nekroptoseablauf sind bis heute noch unklar. Zum einen bilden sich Membranporen von etwa 4 nm Durchmesser (78), zum anderen durch weitere Polymerisierung Amyloid-ähnliche Fasern (80). Beide Mechanismen stellen zentrale Ereignisse der Nekroptose dar und stören die Integrität der Zelle. Beim Zelluntergang, bei dem die Plasmamembran nicht intakt bleibt, tritt Zellmaterial in den extrazellulären Raum aus und durch diese freigesetzten DAMPs wird eine Entzündungsreaktion ausgelöst. Zudem werden dem MLKL weitere Prozesse zugeschrieben, die zum Zelluntergang führen. Phosphoryliertes MLKL aktiviert Kationenkanäle (77, 81) und zerstört somit die Ionen-Homöostase der Zelle. Des Weiteren kann MLKL durch Bindung an Phospholipide direkt zur Permeabilisierung der Plasmamembran beitragen (77, 82). Neben der Rolle als letztes Glied der Nekroptose hat MLKL noch weitere nicht stark erforschte Funktionen. So ist MLKL offensichtlich über verschiedene Mechanismen an weiteren regulierten Zelltodformen beteiligt, darüber hinaus kommt es durch Translokation von MLKL zum Nukleolus zur Regulation von Genexpression und durch eine selektive Bindung an Phospholipide und Cardiolipin zur Blockierung spezifischer Zellprozesse (78).

1.4.4 A20 und weitere Inhibitoren der Nekroptose

Zur Hemmung der entzündlichen Signalkaskade und zur Begrenzung der Entzündungsreaktion bei der Nekroptose exprimieren Zellen endogene negative Regulatoren. Diese setzen an unterschiedlichen Stellen der Signaltransduktion an, führen allesamt aber zum Herabsetzen der nekroptotischen Aktivität.

Unter anderem gehört dazu das TNF-α-induzierte Protein 3 (TNFAIP3), auch als A20 bezeichnet. Die Kodierung dieses antiinflammatorischen Proteins erfolgt auf dem TNFAIP3-Gen, welches auf Chromosom 6 lokalisiert ist (83). N-terminal besteht es aus einer Ovarian Tumor (OTU)-Domäne (84), während das C-terminale Ende aus sieben Cys2-Cys2-Zinkfinger (ZF)-Domänen zusammengesetzt ist (85). Das A20-Protein hat eine wichtige Rolle in der Ubiquitinierung sowie Deubiguitinierung (DUB) von Signalproteinen und ist somit an der Regulation verschiedener Zellvorgänge beteiligt (86) (Abbildung 12). Die OTU-Domäne hat eine DUB-Aktivität, wodurch unter anderem das Signalmolekül RIPK3 deubiquitiniert wird, was die Formation des Nekrosoms behindert (39, 87, 88). Des Weiteren interagiert A20 auch mit RIPK1. Durch seine E3-Ubiguitin-Ligase-Aktivität am ZF4 hat A20 zudem eine ubiquitinierende Funktion. Diese ermöglicht das Ersetzen der Polyubiquitinierung von K63 (an der Aminosäure Lysin an 63. Stelle) durch eine K48-Polyubiquitinierung (an der Aminosäure Lysin an 48. Stelle), was den proteasomalen Abbau von RIPK1 einleitet (86, 89). Darüber hinaus besitzt A20 auch nicht katalytisch vermittelte Funktionen. Durch Bindung an Polyubiquitinketten besetzt A20 Bindungsstellen anderer ubiquitinbindender Proteine, u.a. auch Signalzwischenstufen des NF-kB-Signalwegs, wodurch die NF-kB-Aktivierung gestört wird (86). Zusammengefasst wirkt A20 damit sowohl antiinflammatorisch als auch hemmend auf die Entstehung und das weitere Fortschreiten der Nekroptose. Dementsprechend übernimmt A20 vor allem die Funktion als negativ regulierender Feedback-Mechanismus bei einer gesteigerten proinflammatorischen Stimulierung, wie beispielsweise durch TNF- α , Interleukin 1 (IL-1), Lipopolysaccharide (LPS), T- und B-Zell-Rezeptor-Antigene, sowie Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing Protein 2 (NOD2)-Liganden (86).

Weitere endogene negative Regulatoren der Nekroptose sind die E3-Ubiquitin-Protein-Ligase STIP1 Homology And U-Box Containing Protein 1 (STUB1, auch unter dem Namen CHIP bekannt), welche durch Ubiquitinierung von RIPK1 und RIPK3 zu deren lysosomalen Abbau führt (39, 90), die Mg²⁺/Mn²⁺-abhängige Proteinphosphatase PPM1B, welche über Dephosphorylierung von RIPK3 die Rekrutierung von MLKL verhindert (39, 91), sowie die Aurora-Kinase A (AUKRA), welche die Interaktion zwischen RIPK1 und RIPK3 hemmt (39, 92).

Zwischenzeitlich wurden auch pharmakologische Substanzen entwickelt, die die Nekroptose hemmen. Necrostatin (Nec-1 bzw. Nec-1s) bindet und stabilisiert RIPK1 im inaktivierten Zustand (57, 93), GSK2982772 inhibiert RIPK1 (57, 94), GSK'840, GSK'843 und GSK'872 hemmen RIPK3 (57), Dabrafenib inhibiert die Kinaseaktivität von RIPK3 (57, 95), Ponatinib und Pazopanib (beides Tyrosinkinaseinhibitoren) wirken hemmend auf RIPK1 und RIPK3 (57, 96) und Necrosulfonamide inhibieren das MLKL-Protein (57, 97).


Abbildung 12: Allgemeine Prinzipien der Regulation der TNF-induzierten Zelltodsignalwegs durch A20-vermittelte Deubiquitinierung, modifiziert nach (86)

Die TNF-induzierte Bildung des Signalkomplexes I (RIPK1, cIAP1/2, TRADD und TRAF2/5) an der Zellmembran führt zur Ubiquitin-abhängigen Aktivierung von NF-κB und der NF-κB-abhängigen Expression antiapoptotischer Gene. Die A20-Bindung an M1-Polyubiquitin schützt sie vor Abbau und stabilisiert den Komplex I. Darüber hinaus konkurriert A20 durch die Bindung an M1-Ketten auch mit Ubiquitin-bindenden Proteinen wie dem NF-κB Essential Modulator (NEMO), wodurch die nachgeschaltete NF-κB-Aktivierung gehemmt wird. A20 spaltet auch K63-Polyubiquitin von RIPK3 und hemmt dadurch die RIPK1-RIPK3-Interaktion und Nekroptose.

1.5 Hypothese und Fragestellung

Mit der Entdeckung von RIPK1 im Jahr 1995 und der immer weiter fortschreitenden Erforschung der Nekroptose wie auch anderer Zelluntergangsformen wird ihre Relevanz für physiologische und pathophysiologische Abläufe im menschlichen Körper immer deutlicher. Die Nekroptose ist nicht nur bedeutend in ihrer physiologischen Funktion als regulierte Zelltodform, sondern spielt auch in einer Reihe von Pathologien eine wichtige funktionelle Rolle. Erkrankungen mit pathophysiologischer Relevanz der Nekroptose können in praktisch allen Organen auftreten und betreffen unter anderem auch die Nieren. Hier wurde vor allem bei akutem Nierenversagen (55), aber auch bei der Progression zur chronischen Niereninsuffizienz RIPK1- und RIPK3-abhängige Nekroptose, die mit einer renalen Entzündungsreaktion einhergeht (Nekroinflammation) beschrieben (54, 56).

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte die protektive Rolle von A20 bei der Immunkomplex-Glomerulonephritis (im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis der Maus) nachgewiesen werden. Bei heterozygot A20-defizienten Mäusen trat im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen eine verstärkte Entzündungsreaktion und vermehrter Zelltod auf, was mit einer verstärkten Nierenschädigung korrelierte. Bei fehlendem Nachweis von aktivierter Caspase 3 als Apoptosemarker und damit Ausschluss der Apoptose als zugrundeliegende Zelltodform wiesen weitere Ergebnisse dieser Arbeit übereinstimmend mit der bekannten Nekroptose-inhibierenden Funktion von A20 auf verstärkt ablaufende Nekroptose bei heterozygoter A20-Defizienz während der Glomerulonephritis hin (98, 99). Folglich könnte auch bei der chronischen Niereninsuffizienz, induziert durch eine diabetische Stoffwechsellage, eine entzündungsbegrenzende und Nekroptose-inhibierende und damit nephroprotektive Funktion von A20 bestehen. Tatsächlich deuten zunehmende Hinweise darauf hin, dass bei der diabetischen Nephropathie eine auftretende renale Inflammation zur Entstehung und Fortschreiten der Erkrankung beiträgt (27-29). Dagegen ist eine mögliche pathophysiologische Rolle der Nekroptose und ihre Inhibition durch A20 bei der diabetischen Nephropathie bisher nicht genauer untersucht. Demzufolge ist eine genauere Charakterisierung von Nekroptose-betreffenden molekularen Ereignissen, vor allem in Bezug zur renalen Schädigung bei der diabetischen Nephropathie erforderlich. Durch ein verbessertes Verständnis könnten sich neue Biomarker identifizieren und therapeutische Ansätze entwickeln lassen, um die Entstehung und das Fortschreiten der diabetischen Nephropathie zu verhindern.

Die Fragestellung dieser Arbeit lautete demnach wie folgt:

Welche Rolle spielt die Nekroinflammation bei Progression der diabetischen Nephropathie?

Der Arbeit lag die Hypothese zugrunde, dass die Nekroptose bei der diabetischen Nephropathie einen glomerulären sowie tubulointerstitiellen Zelltod verursacht, der zu einer Entzündungsreaktion und renalen Schädigung führt. Daher sollte sich bei Fehlen der RIPK1- oder der RIPK3-Phosphorylierungsaktivität, sowie bei Fehlen der Pseudokinase MLKL der Verlauf der Diabetesinduzierten chronischen Niereninsuffizienz verbessern. Dies sollte durch verbesserte funktionelle Nierenparameter, einen geringeren Nierenschaden und geringere renale Entzündungsreaktion charakterisiert sein. Bei Defizienz des physiologischen Inhibitors A20 sollte dagegen durch Fehlen seiner antiinflammatorischen und antinekroptotischen Funktion die Progression der diabetischen Nephropathie verstärkt sein, mit vermehrter renaler Inflammation und Zelltod.

Diese Fragestellungen wurden in der vorgelegten Arbeit durch vergleichende Charakterisierung von C57BL/6 Wildtyp-Mäusen und transgenen Mäusen mit inaktivierten Kinaseaktivitäten von RIPK1 oder RIPK3 (Ripk1kd- und Ripk3kd-Mäuse), oder einem Gen-Knockout für MLKL (MIkI-/-Mäuse) untersucht, in denen ein diabetisches Nephropathie-Modell induziert wurde. Für die Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von A20 wurden zudem heterozygot defiziente A20+/-Mäuse mit diabetischer Nephropathie mit ihren Wildtyp-Kontrollen verglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialen

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tierhaltung

Makrolone Typ II und III Käfige	Tecniplast, Hamburg
Filterhaube	Tecniplast, Hamburg
Gitterdeckel	Tecniplast, Hamburg
Trinkflasche mit Edelstahlkappe	Tecniplast, Hamburg
Maushaus rot	Tecniplast, Hamburg
Einstreu	Ssniff Spezialdiäten, Soest
Nestlets	Ancare, Bellmore, NY, USA
Nagestäbchen aus Espenholz	Tapvei, Paekna, Estland
Tierfutter	Ssniff Spezialdiäten, Soest

Genotypisierung

PCR-Thermocycler Bioer GeneTouch PCR-Thermocycler Eppendorf Vapo.protect Elektrophoresekammer PerfectBlue Horizontale Midigelsysteme Elektrophoresekammer MBT Elektrophorese Netzgerät PowerPac 300 UV-Licht Fotolabor Vergrößerungsgerät

Unilaterale Nephrektomie

Kleintier-OP-Tisch Chirurgische Scheren, Klemmen, Nadelhalter Nahtmaterial Vicryl 5-0 Nahtmaterial Ethibond Excel 5-0 Bepanthen Augen- und Nasensalbe Wattestäbchen

Blutzucker-Messung

Blutzuckermessgerät ACCU-Chek Aviva Blutzuckerteststreifen Mouse Restrainer Alpha Laboratories, Eastleigh, UK Eppendorf, Hamburg PEQLAB Biotechnologie, Erlangen

MBT Brand, Gießen Bio Rad Laboratories, Kalifornien, USA Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen DUNCO, Berlin

Medax Nagel, Kiel Integra LifeSciences, Frankreich Ethicon, Cincinnati, Ohio, USA Ethicon, Cincinnati, Ohio, USA Bayer, Leverkusen NOBA Verbandmittel, Wetter

Accu-Chek, Mannheim Accu-Chek, Mannheim Eigenkonstruktion

GFR-Messung

NIC-Kidney Device
Lithium- Polymer Akkumulator (wiederaufladbar)
Akku Ladekabel
Doppelseitige Klebepflaster mit Fenster (3x3 cm)
Klebeband Leukoplast
Isofluran Vaporizer

Durchflusszytometrie

Durchflusszytometer FACSCalibur Becton Dickinson, San Jose, CA, USA Rundboden- Polystyrolröhrchen 5 ml Falcon/ Corning, Corning, NY, USA Zellsieb 70 µm und 100 µm Becton Dickinson, Heidelberg

ELISA

Photometer GENios Plus Tecan, Crailsheim 96-Well Nunc-Immuno-Plate Maxisorp Thermo Fisher, Waltham, MA, USA 96-Well Microwell Plate Thermo Fisher, Waltham, MA, USA

Histologie

Einbettkassetten Paraffin- Ausgießstation EC 350 Mikrotom HM 340E Mirkroskop Leica DM RBE Mikroskopkamera Axiocam 506 color Menzel Deckgläser für Mikroskopie Objektträger Immersionsöl für Mikroskopie

PCR

Homogenisator Ultra Turra T25 basic Spektrophotometer Nano drop 1000 Real-Time PCR System LightCycler 480 Filtriersäulen (Ambion PureLink RNA Mini-Kit) 96 Well Lightcycler Platte Klebefolie, optisch klar

Pipetten

Pipetten Pipetman Multikanalpipette Eppendorf Multikanalpipette Multimate Pipettenspitzen Saphire 1-1000 µl Mannheim Pharma Diagnostics, Mannheim Mannheim Pharma Diagnostics, Mannheim Mannheim Pharma Diagnostics, Mannheim Mannheim Pharma Diagnostics, Mannheim BSN medical, Hamburg Smiths Medical, London, UK

NeoLab Migge, Heildelberg Microm, Heidelberg Microm, Heidelberg Leica Microsysteme, Wetzlar Carl-Zeiss, Oberkochen Thermo Fisher, Waltham, MA, USA Thermo Fisher, Waltham, MA, USA PanReac AppliChem, Chicago, IL, USA

IKA GmbH, Staufen PEQLAB Biotechnology, Erlangen Roche, Basel, Schweiz Thermo Fisher, Waltham, MA, USA Sarstedt AG & Co. KG Sarstedt AG & Co. KG

Gilson, Middleton, WI, USA Eppendorf AG, Hamburg HTL, Warschau, Polen Greiner Bio- One, Kremsmünster, AUT

2 Material und Methoden

Pipettierhilfe Pipetus- Classic Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml

Waage

Taschenwaage Präzisionswaage BP 110S Präzisionswaage Mettler PJ300

Zentrifugen

Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R Zentrifuge 5415 D Mini- Zentrifuge Sprout

Weitere Geräte

Autoklav 23 Thermomixer comfort Thermomixer compact Wasserbad Vortex Genie 2 pH-Meter Perfusionsgerät

Weitere Verbrauchsmaterialien

Sterile Abdecktücher Eppendorfgefäße 0,2 ml/ 1,5 ml/ 2 ml Skalpell No. 11 Rasierklinge Wilkinson Sword (zweischneidig) Zellkulturschalen Ø 53 und 87 mm Spritzen 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml Microlance Kanülen 20 G, 26 G und 30 G Konische Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml Mikropipetten 20 µl Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt BD, Heidelberg

G&G, Kaarst Sartorius, Göttingen Mettler-Toledo, Columbus, Ohio, USA

Heraeus Sepatech, Osterode Eppendorf, Hamburg Heathrow Scientific, Illinois, USA

Melag Medizintechnik, Berlin Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg GFL, Burgwedel Bender & Hobein, Zürich, Schweiz WTW, Weilheim Eigenkonstruktion

Medline, Northfield, IL, USA Eppendorf, Hamburg Feather Safety Razor, Osaka, Japan Wilkinson, High Wycombe, UK TPP, Trasadingen, Schweiz Becton Dickinson, Heidelberg Becton Dickinson, Heidelberg Becton Dickinson, Heidelberg Brand, Wertheim

2.1.2 Chemikalien, Lösungen und Puffer

2.1.2.1 Genotypisierung

Probenaufbereitung

DirectPCR Lysis Reagent (Tail) Proteinase K Viagen Biotech, LA, USA Qiagen, Hilden

PCR-Mix

10X Standard Taq	Reaction Bu	uffer	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Taq DNA Polymera	ase		New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
dNTP Set			Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
A20-Primer	A20 5a	GAA CTG TCT CA	G CAT TGA C
	A20 Neo	CTC GTG CTT TA	C GGT ATC

CCA CCA CCA TTC AAT CCT

Gelelektrophorese

Agarose	Invitrogen, Waltham, MA, USA
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merck, Darmstadt
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Carl Roth, Karlsruhe
6X DNA Loading	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Low MW DNA Ladder	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

Low MW DNA Ladder

Tabelle 3: Ansatz für den TBE-Puffer für die Gelelektrophorese

A20 3a

Rezept für TBE-Puffer (TRIS-Borat-EDTA-Puffer)		
Aqua dest.		
89 mM	TRIS	
89 mM	Borsäure	
2 mM	EDTA	
pH von 8,0		

2.1.2.2 Tierexperimente

Medikamente im Rahmen operativer Eingriffe

Narkose:	Fentanyl	Janssen-Cilag, Neuss
	Midazolam	Ratiopharm, Ulm
	Medetomidin	Zoetis, Parsippany, New Jersey, USA
Antagonisten:	Atipamezol	CP-Pharma, Burgdorf
	Flumazenil	Hexal, Holzkirchen
	Naloxon	Ratiopharm, Ulm
Analgetikum:	Buprenorphin	Bayer, Leverkusen

Diabetesinduktion

Streptozotocin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Citronensäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Tabelle 4: Ansatz für die Streptozotocin-Lösung

Streptozotocin-Injektion (5 mg/ml)
400 μl 0,1 M Natriumcitrat
600 μl 0,1 M Citronensäure
рН 4,3
5 mg Streptozotocin

Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate

Isofluran	CP-Pharma, Burgdorf
FITC-Sinistrin	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Blutabnahme	

Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA) Carl Roth, Karlsruhe

2.1.2.3 Durchflusszytometrie

Gewebeaufbereitung	
DNase IV	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Kollagenase Typ I	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Aqua injectable	Braun, Melsungen
BSA	Roche, Mannheim
DPBS (Phosphate Buffered Saline)	Pan Biotech, Aidenbach
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
Glukose	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerin	Sigma, Deisenhofen
TRIS	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid- Dihydrat	Merck, Darmstadt

Magnesiumchlorid Magnesiumsulfat Fermentas Scientific, Waltham, USA Carl Roth, Karlsruhe

Lösungen für den Durchflusszytometer

FACS Clean	Beckton Dickinson, Heidelberg
FACS Flow	Beckton Dickinson, Heidelberg
FACS Rinse	Beckton Dickinson, Heidelberg

Tabelle 5: Ansätze für die bei der Durchflusszytometrie verwendeten Lösungen

Facs Buffer (500 ml)	Paris Buffer	
DPBS	Aqua dest.	
0,5 g Natriumazid (NaN₃)	20 mM TRIS-HCL	
1,0 g BSA	125 mM Natriumchlorid (NaCl)	
	10 mM Kaliumchlorid (KCL)	
	10 mM Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂)	
	5 mM Glukose	
	рН 7,4	
10x HBSS (Hank's balanced salt solution) without Ca ²⁺ , Mg ²⁺ (1000 ml)	n) 10x HBSS (Hank's balanced salt solution) with Ca ²⁺ , Mg ²⁺ (1000 ml)	
Aqua dest.	Aqua dest.	
4 g Kaliumchlorid (KCl)	4 g Kaliumchlorid (KCl)	
0,6 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	0,6 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	
80 g Natriumchlorid (NaCl)	80 g Natriumchlorid (NaCl)	
0,621 g Natriumdihydrogenphosphat	0,621 g Natriumdihydrogenphosphat	
(Na ₂ HPO ₄)	(Na ₂ HPO ₄)	
	3,5 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	
	1,4 g Calciumchlorid (CaCl ₂)	
	1 g Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	
	1 g Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	
	10 g Glukose	
	pH 7,4	
DNase (1 mg/ml)	Kollagenase/ DNase in HBSS-Puffer	
DNase Typ III 15,000 U/ 6 mg	1x HBSS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	
6 ml 20 mM Tris/HCL (pH 7,5)	1,0 mg/ml Kollagenase Typ I	
50% (wt/vol) Glycerin	0,1 mg/ml DNAse Typ IV	
1 mM Magnesiumchlorid (MgCl ₂)		
Kollagenase in HBSS-Puffer	2 mM EDTA Solution in HBSS-Puffer	
1x HBSS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	1x HBSS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	
1 mg/ml Kollagenase	10 µl/ml 0,2 EDTA-Stammlösung	

2.1.2.4 ELISA

Mouse Albumin ELISA Quantitation Kit	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Phosphate-Buffered Saline (PBS)	Pan Biotech, Aidenbach
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Bovine Serum Albumin Fraction V (BSA)	Roche, Basel, Schweiz
TMB Substrat Reagent Set	Becton Dickinson, Heidelberg
Schwefelsäure	Carl Roth, Karlsruhe

Tabelle 6: Ansätze für die bei dem ELISA verwendeten Lösungen

Carbonatpuffer (pH 9,6)	PBS/Tween	PBS/Tween/BSA
1,59 g Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	1 L PBS	100 ml PBS
2,93 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	500 μl Tween	50 µl Tween
1 L Millipore H2O		0,0 g 20/ (

2.1.2.5 Histologie

Gewebeaufbereitung

Formalin, 4% neutral gepuffert	Morphisto, Offenbach am Main
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Ethanol EMSURER ACS, ISO, Reag. Ph Eur	Merck, Darmstadt
Xylol	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Paraplast for tissue embedding	Merck, Darmstadt
Aceton	Merck, Darmstadt

Färbereagenzien

DPBS (Phosphate Buffered Saline)	Pan Biotech, Aidenbach
Tris	Merck, Darmstadt
Perjodsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Schiffs Reagenz	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Antigen Unmasking Lösung	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Carl Roth, Karlsruhe
3,3'-Diaminobenzidine	Merck, Darmstadt
Methylgrün	Fluka, Seelze
VectaMount Permanent Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

In Situ Cell Death Detection-Kit (TUNEL-Kit)

Roche, Basel Schweiz

DAB-Arbe	eitslösung	Methylgr	ün
5 g 132 ml	3'3-Diaminobenzidine	735 ml	0,1 M Essigsäure (CH₃COOH)
60-80 ml	80 ml 1 M Salzsäure (HCl)	265 ml	0,1 M Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂)
		pH 4,2	
		20 g	Methylgrün

Tabelle 7: Ansätze für die bei der histologischen Aufbereitung verwendeten Lösungen

2.1.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

RNA-Isolierung

RNAlater	Ambion, Kaufungen
RNase AWAY	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PureLink RNA Mini Kit	Ambion, Kaufungen
Ethanol absolut zur Analyse	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe

Reverse Transkription

5x First Strand Buffer	Invitrogen, Waltham, MA, USA
dNTP Set	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA.
0,1 M DTT	Invitrogen, Waltham, MA, USA
Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Hexanucleotide Mix (10x konzentriert)	Roche, Basel, Schweiz
Linear Acrylamide	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
SuperScript II (Reverse Transkriptase)	Invitrogen, Waltham, MA, USA

Quantitative Real-Time PCR

Taq DNA Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Nuclease-freies Wasser	Ambion, Kaufungen
SYBR Green I Nukleinsäure Gel-Farbstoff	Fluka, Seelze
BioStab PCR Optimizer	Bitop, Dortmund
10X Taq Buffer without Detergent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
MgCl ₂ 25 mM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Bovine Serum Albumin (BSA für PCR)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
dNTP Set	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Tabelle 8: M	Mastermixansatz	mit SYBR	für die	PCR
--------------	-----------------	----------	---------	-----

Rezept für 50 ml qPCR Mastermix mit SYBR:			
20 ml	PCR Optimizer		
10 ml	10X Taq Buffer without Detergent		
12 ml	MgCl ₂ 25 mM		
6,05 ml	ddH2O		
1 ml	BSA PCR grade		
0,75 ml	dNTPs (25 mM je Base)		
0,2 ml	SYBR Green I		

2.1.3 Antikörper und Enzyme

FACS

Alexa Fluor® 488-Hamster anti-Maus CD3e, Klon 145-2C11	Beckton Dickinson, Heidelberg
Alexa Fluor® 647-Ratte anti-Maus CD4, Klon RM4-5	Beckton Dickinson, Heidelberg
PE-Cy™5-Ratte anti-Maus CD8a, Klon 53-6.7	Beckton Dickinson, Heidelberg
PerCP-Cy™5.5 Ratte anti-Maus CD11b, Klon M1/70	Beckton Dickinson, Heidelberg
FITC Hamster anti-Maus CD11c, Klon HL3	Beckton Dickinson, Heidelberg
PE Hamster anti-Maus CD11c, Klon HL3	Beckton Dickinson, Heidelberg
APC Ratte anti-Maus CD45, Klon 30-F11	Beckton Dickinson, Heidelberg
PE Ratte anti-Maus CD45, Klon 30-F11	Beckton Dickinson, Heidelberg
FITC Ratte anti-Maus Ly-6C, Klon AL-21	Beckton Dickinson, Heidelberg
FITC Ratte anti-Maus Ly-6G, Klon 1A8	Beckton Dickinson, Heidelberg
APC Ratte anti-Maus F4/80, Klon T45-2342	Bio-Rad, Hercules, California, USA

ELISA

Mouse Albumin ELISA Quantitation Kit Creatinine FS Kit

Immunhistologie

Ratte Anti-Mensch CD3, Klon CD3-12	
Ratte Anti-Maus F4/80, Klon CI:A3-1	
Ratte Anti-Maus ER-HR3, Klon ER-HR3	

Bethyl Laboratories, Montgomery, USA DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim

Serotec, Düsseldorf Serotec, Düsseldorf BMA Biomedical, Augst, Schweiz

2.1.4 Primer

Tabelle 9:	Verwendete	Real-Time	PCR	Primer
------------	------------	------------------	-----	--------

Gen	Forward-Primer	Reverse-Primer
Ccl2	5'-CCTGCTGTTCACAGTTGCC-3'	5'-ATTGGGATCATCTTGCTGGT-3'
Ccl5	5'-CCACTTCTTCTCTGGGTTGG-3'	5'-GTGCCCACGTCAAGGAGTAT-3'
Cxcl5	5'-CCGCTGGCATTTCTGTTGCTGT-3'	5'-CAGGGATCACCTCCAAATTAGCG-3'
Cxcl9	5'-CTGTTCCTGCATCAGCACCAAC-3'	5'-TGAACTCCATTCTTCAGTGTAGCA-3'
Cxcl10	5'-GGCTGGTCACCTTTCAGAAG-3'	5′-ATGGATGGACAGCAGAGAGC-3′
Tnf-α	5'-AGGGTCTGGGCCATAGAACT-3'	5'-CCACCACGCTCTTCTGTCTAC-3'
lfn-α	5'-CCTGTGTGATGCAACAGGTC-3'	5'-TCACTCCTCCTTGCTCAATC-3'
lfn-γ	5'-ACAGCAAGGCGAAAAAGGAT-3`	5'-TGAGCTCATTGAATGCTTGG-3'
II-1β	5'-TTCCTTGTGCAAGTGTCTGAAG-3'	5'-CACTGTCAAAAGGTGGCATTT-3'
II-6	5'-TGATGCACTTGCAGAAAACA-3'	5'-ACCAGAGGAAATTTTCAATAGGC-3'
II-10	5'-ATCGATTTCTCCCCTGTGAA-3'	5'-TGTCAAATTCATTCATGGCCT-3'
iNos	5'-TTCTGTGCTGTCCCAGTGAG-3'	5'-TGAAGAAAACCCCTTGTGCT-3`
Kim1	5'-TGGTTGCCTTCCGTGTCTCT-3'	5'-TCAGCTCGGGAATGCACAA-3'
Ngal	5'-AATGTCACCTCCATCCTGGT-3'	5'-ATTTCCCAGAGTGAACTGGC-3'
Procollagen 1	5'-ACATGTTCAGCTTTGTGGACC-3'	5'-TAGGCCATTGTGTATGCAGC-3`
Procollagen 4	5'-GTCTGGCTTCTGCTGCTCTT-3'	5'-CACATTTTCCACAGCCAGAG-3'
Fibronectin	5'-GGAGTGGCACTGTCAACCTC3'	5′-ACTGGATGGGGTGGGAAT-3′
Laminin	5'-CATGTGCTGCCTAAGGATGA-3'	5'-TCAGCTTGTAGGAGATGCCA-3'
α-Sma	5'-ACTGGGACGACATGGAAAAG-3'	5'-GTTCAGTGGTGCCTCTGTCA-3'
Fsp1	5'-CAGCACTTCCTCTCTCTGG-3'	5′-TTTGTGGAAGGTGGACACAA-3′
Tgf-β	5'-GGAGAGCCCTGGATACCAAC-3'	5'-CAACCCAGGTCCTTCCTAAA-3'
Ctgf	5'-AGCTGACCTGGAGGAAAACA-3'	5'-CCGCAGAACTTAGCCCTGTA-3'
18S	5'-GCAATTATTCCCCATGAACG-3'	5'-AGGGCCTCACTAAACCATCC-3'
Gapdh	5'-CATGGCCTTCCGTGTTCCTA-3'	5'-CCTGCTTCACCACCTTCTCA-3'

2.1.5 Software

MPD-Lab Application, Version 1, Mannheim Pharma & Diagnostics, Mannheim Xfluor4, Version V 4.51, Tecan Systems, Männedorf, Schweiz CellQuest Pro, Version 6.0, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA Leica QWin Standard, Version 2.5, Leica Microsystems Imaging Solutions, Wetzlar Photoshop CS5, Version 12.0, Adobe, San José, Kalifornien, USA Nanodrop 1000, Version 3.8.1, Becton Dickinson, Waltham, Massachusetts, USA LightCycler Software 480, Version 1.5.0.39, Roche, Mannheim Prism, Version 8.0.1, GraphPad, San Diego, Kalifornien, USA Microsoft Office Professional Plus 2016, Redmond, Washington, USA Endnote, Version 20.1, Clarivate, Philadelphia, USA

2.2 Tierexperimentelle Methoden

2.2.1 Versuchstiere

Charles River Laboratories, Sulzfeld
Peter J. Gough, Pattern Recognition Receptor Discovery Performance Unit, GlaxoSmithKline, Collegeville, USA (100)
Peter J. Gough, Pattern Recognition Receptor Discovery Performance Unit, GlaxoSmithKline, Collegeville, USA (101)
Prof. Dr. Stefan Krautwald, Klinik für Innere Medizin IV - Nieren und Hochdruckerkrankungen, Universitätsklinikum Schleswig- Holstein, Campus Kiel, Deutschland (102)
Averil Ma, Department of Medicine, The University of Chicago, 58 41 South Maryland Avenue, MC 6084, Chicago, IL 60637, USA (103)
Averil Ma, Department of Medicine, The University of Chicago, 58 41 South Maryland Avenue, MC 6084, Chicago, IL 60637, USA (103)

Alle in dieser Arbeit verwendeten Versuchstiere haben einen C57BL/6 Hintergrund und wurden ursprünglich von Charles River Laboratories bezogen. Es wurden für unsere Versuche ausschließlich männliche Tiere im Alter von 7-9 Wochen verwendet. Die gesamte Versuchsdauer erstreckte sich über insgesamt 25-27 Wochen.

Die in den Experimenten verwendeten Ripk1^{K45A/K45A} (Ripk1kd) wie auch Ripk3^{K51A/K51A} (Ripk3kd) Versuchstiere wurden freundlicherweise von Herrn Peter J. Gough (Pattern Recognition Receptor Discovery Performance Unit, GlaxoSmithKline, Collegeville, USA) zur Verfügung gestellt. Bei Ripk1kd-Mäusen führt eine Punktmutation im katalytischen Lysin (K45A) in Exon 3 des Ripk1-Gens zu einer Inaktivierung der Kinaseaktivität des Ripk1-Moleküls, welche eine essentielle Rolle in der Ripk1-vermittelten Nekroptose spielt. Dabei wird das Ripk1-Molekül weiterhin exprimiert und seine essentiellen Kinase-unabhängigen Funktionen bleiben erhalten (100).

Die bei den Ripk3kd-Versuchstieren eingeführte Punktmutation am K51A in Exon 2, bei gleichzeitigem Einsetzen einer Neomycin-Resistenz-Genkassette in Intron 3, führt vergleichsweise zu einer Ausschaltung der für die Ripk3-vermittelte Nekroptose wichtige Kinaseaktivität, bei trotz leicht verminderter Expression von Ripk3 erhaltener Kinase-unabhängiger Ripk3 vermittelter Funktionen (101).

Mlkl-defiziente-Mäuse (Mlkl-/-) wurden uns von Prof. Dr. Stefan Krautwald, (Klinik für Innere Medizin IV, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) zur Verfügung gestellt. Diese homozygot Mlkl-defizienten Mäuse waren ursprünglich durch Knockout des Mlkl-Gens mit Insertion eines modifizierten Mlkl-Allels, das eine Deletion von Exon 3 bewirkt, generiert worden. Dadurch wird die Expression des Mlkl-Moleküls, das das Effektormolekül der RIPK1-/RIPK3-vermittelten Nekroptose darstellt, unterbunden (102).

Als Kontrolle wurden Wildtyp-Versuchstiere mit dem übereinstimmenden C57BL/6NCrl-Hintergrund verwendet.

Des Weiteren wurden heterozygot defiziente A20+/- Mäuse untersucht, bei denen eine PGK-neo-Kasette in reverser Transkriptionsorientierung die Exone 1-4 ersetzt. Die heterozygot-defizienten Mäuse waren phänotypisch nicht von C57BL/6 NCrl Wildtyp-Mäusen zu unterscheiden. Dagegen entwickeln homozygote A20-/- Mäuse disseminierte Gewebeentzündungen aufgrund eines spontanen Inflammationssyndroms. Bei Geburt weisen sie ein auffällig vermindertes Geburtsgewicht auf, ihre Lebenszeit beträgt nur einige wenige Wochen (103). Die bei heterozygoter Zucht von A20+/- Mäusen geworfenen A20-/- Tiere wurden daher unmittelbar nach Geburt und Genotypisierung euthanasiert. Die in den Experimenten verwendeten Wildtyp-Kontrollen bestanden zum einen Teil aus Wurfgeschwistern (A20+/+) wie auch extern erworbenen Wildtyp-Mäusen.

2.2.2 Genotypisierung

Bei der Arbeit mit gentechnisch veränderten Mäusen muss zur Feststellung des exakten Genotyps eine molekulargenetische Untersuchung durchgeführt werden. Eine besondere Rolle spielt dieses Verfahren bei der Arbeit mit A20+/- Mäusen, da bei der heterozygoten Verpaarung nach den Mendelschen Regeln Nachkommen mit den Genotypen A20+/+, A20+/- und A20-/- auftreten können. Während die Versuchstiere vom Genotyp A20+/+ als Wildtyp und A20+/- (heterozygoter Knockout) als gesuchter Genotyp für die weiteren Experimente benötigt wurden, sind die A20-/homozygoten Knockout-Tiere nicht überlebensfähig und ihre durchschnittliche Lebensdauer beträgt lediglich einige wenige Wochen (103). Mäuse dieses Genotyps wurden daher aus Tierschutz-Gründen nach Geburt und Genotypisierung euthanasiert.

Für die Genotypisierung konnten die bei der Markierung anfallenden Ohrlochstanzen von 1-2 mm Durchmesser verwendet werden. Das Gewebe wurde im ersten Schritt durch Zugabe von 150 µl PCR-Direct (Viagen) mit 1 µl Proteinase K bei 55°C im Thermomixer für 3-5 Stunden unter ständigem Rütteln (1200 U/min) lysiert. Im Anschluss wurde die Proteinase K durch Erhitzen der Probe für 45 min auf 85°C inaktiviert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 Minuten bei 15.000 g, woraufhin die DNA in 1 µl des Überstands mit 24 µl des PCR-Mixes versetzt wurde. Dieser PCR-Mix setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

- 15,8 µl H20
- 2,5 µl 10x Standard Taq Reaction Buffer
- 4,0 µl dNTPs (Konzentration 1,25mM)
- 0,5 µl Primer A20 5a (1:10)
- 0,5 µl Primer A20 NEO (1:10)
- 0,5 µl Primer A20 3a (1:10)
- 0,2 µl Taq-Polymerase (5.000 U/ml)
- 1,0 µl DNA

Daraufhin fand der Amplifikationsschritt im Mastercycler statt. Der Ablauf sah wie folgt aus:

	Dauer (in Minuten)	Temperatur (in °C)	
Vorabdenaturierung	5	94	
Denaturierung	1	94	
Annealing	1	52	34x Wiederholungen
Elongation	2	72	
Polymerisation	5	72	
ENDE		4	

Tabelle ⁴	10. Finstellun	asnarameter für	die Durch	führung der	PCR bei de	er Genoty	nisieruna
Iavene	IV. LIIISICIIUII	yoparameter rui		iuni ung uei	FOR DELU	er Genoly	pisierung

Aufgrund der ausgewählten Primer-Sequenzen entstanden abhängig vom vorliegenden Genotyp der Maus unterschiedlich lange A20-Gen-Amplifikate. Für die anschließende Trennung der amplifizierten Genprodukte nach ihrer Länge und Ladungseigenschaft wurde eine Gelelektrophorese als analytische Methode angewandt. Das hierfür benötigte Elektrophoresegel setzte sich zusammen aus 2% Agarose (3 g), welches in 1x-TBE-Puffer (150 ml) gelöst und erhitzt wurde. Zusätzlich wurde es mit 7,5 µl Ethidiumbromid versetzt. Diese Mischung wurde in eine Form gegossen und durch Einsatz eines Kamms konnten Probentaschen in der Gelplatte gebildet werden. Die Platte ließ man über mehrere Stunden aushärten. Anschließend wurde jeweils 25 µl Probe mit 5 µl 6x-DNA-Ladepuffer verdünnt und 5 µl der entstandenen Mischung in die vorgeformten Taschen überführt. Zur Größenorientierung wurde eine DNA-Leiter als Größenstandard auf das Gel aufgetragen und schließlich ein elektrisches Feld (200 Volt, 400 Ampere) über 30 Minuten angelegt. Zur Auswertung wurde das durch die unterschiedliche Wandergeschwindigkeit entstandene Bandenmuster in einer Dunkelkammer unter UV-Licht fotografiert.

Das Wildtyp-A20 Gen mit einer Länge von 664 Basenpaaren ist länger als das A20 Knockout-Gen mit 590 Basenpaaren, wodurch beim Ersteren eine Bande mit einer geringeren Laufstrecke zu verzeichnen ist. Heterozygote Mäuse wiesen zwei Banden auf (Abbildung 13).



A20 +/+ A20 -/- A20 +/-

Abbildung 13: Genotypisierung der A20+/- Versuchstiere

2.2.3 Tierhaltung

Um die Einhaltung von Hygienestandards und Tierschutzvorschriften zu gewährleisten, erfolgte die Zucht und Haltung der Versuchstiere in der Tierhaltung der Medizinischen Klinik IV in der Schillerstraße 42. Diese Einrichtung erfüllt die SPF (Specific Pathogen Free) Bedingungen und wurde in regelmäßigen Abständen anhand von mikrobiologischen Untersuchungen geprüft. Die artgerechte Haltung wurde jederzeit eingehalten. Ein Makrolone Typ II Käfig bzw. bei besonders polyurischen Versuchstieren Typ III (Tecniplast, Hohenpeißenberg) wurde von höchstens 5 Versuchstieren geteilt und regelmäßig, mindestens einmal die Woche gewechselt. In den Käfigen befanden sich autoklaviertes Einstreu, Nestletts, Nagestäbchen und Häuschen. Trinkwasser (autoklaviertes VE-Wasser) wie auch Trockenpelletfutter (Ssniff Spezialdiäten, Soest) waren für die Versuchstiere stets verfügbar. In der Tierhaltung wurden konstante Bedingungen geschaffen, die

eine Raumtemperatur von 22-23°C, eine Luftfeuchtigkeit von 50-60%, sowie eine Hell-Dunkel-Rhythmik von 12 Stunden zur Nachahmung einer Tag-Nacht Rhythmik einschließen. Jungtiere wurden nach drei Wochen abgesetzt, geschlechterspezifisch getrennt und durch eine Lochmarkierung am Ohr gekennzeichnet. Alle durchgeführten Tierexperimente wurden nach den Vorschriften des Deutschen Tierschutzgesetzes und entsprechender Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern durchgeführt.

2.2.4 Überblick Versuchsablauf

Ein Überblick über den zeitlichen Ablauf des Mausmodells der diabetischen Nephropathie ist im folgenden Schema (Abbildung 14) dargestellt. Die einzelnen Schritte werden in den folgenden Kapiteln ausführlich beschrieben.



Abbildung 14: Ablauf des Tiermodells der diabetischen Nephropathie

Männliche Versuchstiere im Alter von 7-9 Wochen wurden zwei Wochen vor Versuchsbeginn unilateral nephrektomiert. In der Woche 0 erfolgte über fünf aufeinander folgenden Tagen die Diabetesinduktion mittels STZ mit anschließender wöchentlicher Kontrolle von Gewicht und Blutzucker. In Woche 23 bzw. 25, zwei Wochen vor Versuchsende, erfolgte die transkutane GFR-Bestimmung, bevor in Woche 25 bzw. 27 Urinentnahme und Gewebeisolation durchgeführt wurden. STZ, Steptozotocin; GFR, glomeruläre Filtrationsrate.

2.2.5 Injektionsnarkose und Antagonisierung

Alle genannten Arzneimittel wurden von der tierärztlichen Hausapotheke des Klinikums der LMU München bezogen.

Die Injektionsnarkose (2,5 ml/kg Körpergewicht) setzt sich wie folgt zusammen:

Ansatz Injektionsnarkose berechnet für 1000 g	Dosierung des Narkosemixes
1 ml Fentanyl (Fentanyl, 0,05 mg/ml)	Fentanyl 0,05 mg/kgKG
1 ml Midazolam (Dormicum, 5 mg/ml)	Dormicum 5 mg/kgKG
0,5 ml Medetomidin (Dormitor, 1 mg/ml)	Medetomidin 0,5 mg/kgKG

Tabelle	11:	Ansatz	der	In	jektion	snark	ose

Das gewichtsadaptierte Volumen wurde intraperitoneal im Winkel von 30-40° appliziert. Es wurde der Nackengriff angewendet und das Versuchstier kopfwärts, zum Schutz vor einer Punktion der inneren Organe, geneigt. Ein zusätzliches kurzes Zurückziehen der Spritze vor der Applikation dient ebenfalls zur Vermeidung der Gabe des Narkosemixes in eines der intraperitoneal liegenden Organe. Ein ausgefallender Zwischenzehreflex wurde als ausreichende Narkosetiefe gewertet.

Der Antagonistenmix (8,5 ml/kg Körpergewicht) ist eine Mischung bestehend aus folgenden Pharmazeutika:

Ansatz Antagonistenmix berechtnet für 1000 g	Dosierung des Antagonistenmixes
0,5 ml Atipamezol (Antisedan, 5 mg/ml)	Atipamezol 2,5 mg/kgKG
5 ml Flumazenil (Anexate, 0,1 mg/ml)	Flumazenil 0,5 mg/kgKG
3 ml Naloxon (Narcanti, 0,4 mg/ml)	Naloxon 1,2 mg/kgKG

Die Antagonisierung erfolgt subkutan. Hierzu wird am Nacken in Längsrichtung eine Hautfalte gebildet und der Antagonistenmix appliziert. Bei richtiger Applikation bildet sich unter der Haut ein spürbares Medikamenten-Reservoir.

2.2.6 Unilaterale Nephrektomie

Die diabetische Nephropathie ist eine chronische Erkrankung, bei der die Nierenschädigung infolge einer langandauernden Hyperglykämie auftritt. Die Frühstadien sind durch eine glomeruläre Hyperfiltration gekennzeichnet, die einen wichtigen Pathomechanismus des progredienten Nierenschadens darstellt (26, 104). Um im Mausmodell bei begrenzter Versuchsdauer den renalen Schaden zu akzelerieren wurde bei den Versuchstieren in der siebten bis neunten Woche, zwei Wochen vor der Induktion des Diabetes, eine unilaterale Nephrektomie durchgeführt. Dies löst eine deutliche Hyperfiltration der verbliebenen Niere aus und verstärkt damit die nachfolgende diabetische Schädigung im Versuchszeitraum von 25 bzw. 27 Wochen.

Der operative Eingriff der Nephrektomie erfolgte unter sterilen Bedingungen mit Arbeiten unter dem Laborabzug und Verwendung steriler Einwegprodukte und autoklavierter Materialien. Das Versuchstier wurde anästhesiert in seitlicher Lage auf einer Wärmeplatte (Kleintier-OP-Tisch, Medax Nagel), welche zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur auf 40°C eingestellt war, mithilfe von Klebebändern fixiert. Zum Schutz der Kornea vor Austrocknung, bei ausfallendem Lidschlussreflex unter der Narkose, wurde Bepanthen Augen- und Nasensalbe auf die Augen appliziert. Bei der Intervention erfolgten zunächst eine Rasur und Desinfektion des Operationsgebietes mit 70% Alkohol. Es folgte ein Hautschnitt, Trennung der Hautschicht von der darunterliegenden Muskelschicht und schließlich einem Schnitt durch die Muskelschicht und das Peritoneum. Die Niere wurde aufgesucht und aus der Schnittfläche gehoben, der Nierenhilus mit einer Pinzette gefasst und mittels eines nicht-absorbierbaren Fadens (5-0 Ethibond) mit einem Doppelknoten ligiert. Distal der Ligatur wurde die Niere am Hilus abgetrennt. Nach Sicherstellung der Suffizienz der Ligatur und Kürzung der abstehenden Fadenenden schloss sich die Naht an, wobei bei der inneren Muskelschicht und dem Peritoneum absorbierbares Material (5-0 Vycril) verwendet und

bei der Hautnaht nicht-absorbierbare Fäden genutzt wurden. Es erfolgte zur Ausleitung der Narkose eine subkutane Injektion des Antagonisten-Mixes und eine Analgesie durch Buprenorphin subkutan (0,05 mg/kg Körpergewicht).

Im Rahmen der postoperativen Versorgung wurde den Versuchstieren Schmerzmedikation (Buprenorphin 0,05 mg/kg Körpergewicht) alle 12 Stunden für die nächsten 3 Tage gegeben. Zudem wurde der `Post-surgical Distress and Pain Score´ in regelmäßigen Abständen bestimmt.

2.2.7 Induktion des Diabetes

Allgemeines Funktionsprinzip

Es existieren eine Reihe an diabetischen Tiermodellen, die entweder als Grundlage eine genetische Veränderung aufweisen oder auf einer chemischen Induktion basieren. Die chemisch-induzierten Modelle haben den Vorteil, dass sie ohne die Notwendigkeit des Einkreuzens direkt bei transgenen Mäusen angewendet werden können. Eine häufig genutzte Chemikalie ist dabei das Streptozotocin (STZ) (105).

STZ ist eine natürlich vorkommende Substanz, die zu Anfang durch ihre antimikrobielle Wirkung bekannt war. 1963 wurde erstmals von der diabetogenen Funktion von STZ berichtet (106). Es ist ein Nitroharnstoff-Analogon und besitzt eine alkylierende Wirkung, bei der es durch Transfer einer Alkylgruppe auf die DNA zu einer DNA-Fragmentierung kommt, wodurch die Zelle abstirbt. STZ wirkt selektiv auf die ß-Zellen des Pankreas, da die Chemikalie durch den Glukosetransporter 2 (GLUT2) in die Zelle transportiert wird (Abbildung 15). Vor allem auf den ß-Zellen in den Langerhans-Inseln des Pankreas wird dieser Transporter in hoher Dichte exprimiert (107). Dies ist auch der Grund, weshalb es bis heute als Chemotherapeutikum in der Behandlung von neuroendokrinen Tumoren des Pankreas angewendet wird (108). Demzufolge basiert das chemisch-induzierte diabetische Modell durch STZ auf dem Pathomechanismus des Diabetes mellitus Typ 1, bei dem es durch Untergang der ß-Zellen des Pankreas zu einem absoluten Insulinmangel kommt, was als Folge zu einer Hyperglykämie führt.



Abbildung 15: Wirkung von Streptozotocin in ß-Zellen (105)

Durchführung

Im Alter von 9 bis 11 Wochen, somit 2 Wochen nach der unilateralen Nephrektomie, wurde die Injektion von STZ intraperitoneal an 5 aufeinander folgenden Tagen durchgeführt. Die Versuchstiere mussten hierfür nüchtern sein, damit die Aufnahme des injizierten STZ in die ß-Zellen über

den Glukosetransporter GLUT2 nicht durch Glukose aus der Nahrung kompetitiv gehemmt wird. Daher wurde das Futter jeweils 6 Stunden vor der Applikation aus den Käfigen entfernt. Täglich wurde benötigter Citratpuffer frisch angesetzt und zur Sterilisierung gefiltert. Kurz vor der Injektion wurde abgewogenes STZ-Pulver unter sterilen Bedingungen mit eisgekühltem Puffer (200 µl/mg STZ) vermischt, bis sich das Pulver vollständig löste und keine Rückstände mehr vorhanden waren. Die STZ-Endkonzentration betrug 5 mg/ml. Die Applikation von 40 mg/kg Körpergewicht STZ erfolgte intraperitoneal mit der bereits oben beschriebenen Technik (siehe 2.2.5: Injektionsnarkose und Antagonisierung). Nach einigen Tagen entwickelten die Versuchstiere die diabetische Stoffwechsellage.

2.2.8 Regelmäßige Messung von Gewicht und Blutzucker, Urinentnahme

Kurz vor der ersten STZ-Applikation erfolgte bei den Versuchstieren eine Messung von Gewicht und Blutzucker zur Bestimmung der Ausgangswerte. Anschließend wurden über die Versuchslaufzeit von 25-27 Wochen wöchentlich die Messwerte bestimmt. Die Bestimmung des Gewichts dient zur Kontrolle des gesundheitlichen Status. Aus der Bestimmung der Blutzuckerwerte im Verlauf konnte die Entwicklung des induzierten Diabetes erfasst werden. Hierzu wurde ein elektronisches Blutzuckermessgerät (ACCU-Chek Aviva) genutzt. Nach Fixierung des Versuchstieres in einem Mouse Restrainer wurde die Schwanzvene mit einer Kanüle punktiert. Der austretende Blutstropfen wurde auf der vorgesehenen Stelle des Teststreifens des Blutzuckermessgerätes aufgetragen. Die Blutzuckerkonzentration wurde elektronisch gemessen und der Wert im Messbereich zwischen 10-600 mg/dl auf dem Display angezeigt. Die Blasenentleerung zur Urinentnahme am Versuchsende erfolgte durch leichten Druck auf den Unterbauch und die Harnblase. Die Urintropfen wurden in einem Eppendorfgefäß aufgefangen und bei -20°C gelagert.

2.2.9 Nicht-invasive transkutane Messung der renalen Funktion

Allgemeines Funktionsprinzip

Die durch die chronische diabetische Stoffwechsellage auftretende Nierenschädigung charakterisiert sich durch eine Abnahme der renalen Funktion. Daher wurde jeweils 2 Wochen vor dem Versuchsende die glomeruläre Filtrationsrate durch ein transkutanes Verfahren am wachen Versuchstier bestimmt.

Während früher zur GFR-Bestimmung bis zu 7 Blutabnahmen innerhalb von 75 Minuten durchgeführt werden mussten, was einen enormen Stress für die Versuchstiere darstellte, wurde in der vorliegenden Arbeit eine transkutane Methode angewendet. Zudem bietet dieses Verfahren den Vorteil, dass die Tiere während der gesamten Messung bei Bewusstsein sind, und die gemessenen Werte weniger verfälscht werden (109).

In dieser Methode wurde das Polysaccharid Sinistrin zur Bestimmung der renalen Funktion genutzt. Sinistrin wird ähnlich wie das bekanntere Inulin im Glomerulus frei filtriert und im nachfolgenden Tubulussystem weder sezerniert noch reabsorbiert. Dadurch ist es ein guter Marker zur Bestimmung der GFR. Ist das Sinistrin zusätzlich durch Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC) markiert, kann seine Blutkonzentration durch Lichtemission transkutan gemessen werden. Bei diesem Verfahren wurden kleine Lichtsignalsensoren genutzt (Abbildung 16B), welche aus zwei Dioden und einem Photodetektor bestehen, um das FITC bei 470 nm maximal anzuregen und das emittierte Licht bei 520 nm detektieren zu können. Dieses Gerät wurde mit Lithium-Polymer-Akkumulatoren angetrieben (Abbildung 16C). Es wurde die Geschwindigkeit der Konzentrationsabnahme aufgrund der renalen Eliminierung des FITC-Sinistrins gemessen. Die gemessenen Werte wurden in einem internen Speicher gespeichert und konnten nachfolgend am Computer ausgelesen werden (109, 110) (Abbildung 16D).

Durchführung

Die GFR-Messung erfolgte unter möglichst sterilen Bedingungen. Unter einem Laborabzug wurde den Versuchstieren unter einer Inhalationsnarkose (2-3% Isofluran in medizinischem Sauerstoff 4 L/min) ein etwa 3x3 cm großer Bereich zwischen den Schulterblättern vorsichtig rasiert. Dabei war zu beachten, dass keine Hautläsionen entstehen, da diese die Perfusion des Hautbereiches verändern könnten. Zudem sollte während der ganzen Prozedur die Narkosezeit möglichst geringgehalten werden, da ein abfallender Blutdruck die GFR beeinflussen würde. Im zweiten Schritt wurde oben beschriebenes Gerät mit der Batterie verbunden und auf der rasierten Haut des kurzzeitig narkotisierten Tieres mit Hilfe eines doppelseitigen Aufklebers mit Fensterung für die Dioden angebracht. Ab der Konnektion von Gerät und Batterie begann die Messung. Zum weiteren Schutz wurde das Gerät durch Umwickeln mit medizinischem Klebeband um die Maus weiter stabilisiert, sodass die später wache Maus sich die Apparatur nicht selbst abstreifen konnte (Abbildung 16A). Es wurde 5-10 Minuten abgewartet, in der das Hintergrundsignal aufgenommen wurde. Diese stellte bei der späteren Auswertung die Grundlinie dar. Im narkotisierten Zustand fand nachfolgend die Applikation von 120 mg/kg Körpergewicht FITC-Sinistrin als intravenöse Injektion in den retroorbitalen Venenplexus statt. Im Anschluss wurden die Versuchstiere einzeln in sterilen Käfigen gehalten und die abnehmende FITC-Sinistrin-Konzentration transkutan über 90-120 Minuten gemessen. Anschließend wurde das Gerät vorsichtig entfernt. Die Daten wurden am Computer von der MPD Lab Software ausgelesen und gespeichert. Anhand der Messkurve erfolgte die Berechnung der GFR entsprechend der Formel:

 $GFR[\mu l \ x \ min \ x \ 100g \ K\"{o}rpergewicht] = \frac{14616,8 \ [\mu l/100g \ K\"{o}rpergewicht]}{t_{1/2} \ (FITC - Sinistrin)[min]}$



57



Abbildung 16: Gerät zur transkutanen Messung der glomerulären Filtrationsrate, modifiziert nach (109)

(A) Befestigung des GFR-Messgerätes an einem Versuchstier

(B, C) Gerät zur transkutanen Messung der glomerulären Filtrationsrate mit zugehöriger Batterie

(D) Schematische Darstellung des Funktionssprinzips

2.2.10 Gewebeisolation

Das Versuchsende lag in der 25. bzw. 27. Woche nach der Diabetes-Induktion mit STZ. Den Versuchstieren wurde eine Urinprobe abgenommen, bevor sie für die Organentnahme getötet wurden. Die Anästhesie erfolgte wie oben beschrieben (2.2.5 Injektionsnarkose und Antagonisierung). Bei einem ausgefallenem Zwischenzehreflex wurde mit der Blutentnahme begonnen. Hierzu wurde eine feine Glaskapillare über den lateralen Augenwinkel in das retroorbitale Venennetz eingeführt. Das austretende Blut wurde in einem Eppendorfgefäß, welches zuvor mit 30 µl 0,5 M EDTA vorbereitet wurde, gesammelt. Das Plasma, als Überstand nach Zentrifugation, wurde zur Analyse verschiedener Plasmaparameter durch das Institut für Labordiagnostik am Klinikum Innenstadt der LMU, Ziemssenstraße 1 verwendet.

Für die anschließende Organentnahme wurde das Versuchstier rücklings auf eine flache Unterlage gelegt und an den Extremitäten fixiert. Nach einer Desinfektion mit 70% Alkohol wurde die Bauchhöhle des tiefnarkotisierten Tieres eröffnet und nachfolgend eine Thorakotomie durchgeführt. Das Herz wurde aufgesucht und die V. cava inferior als Austrittspforte der nachfolgend applizierten Perfusionslösung herznah durchgetrennt. Der linke Ventrikel wurde punktiert und der Körperkreislauf mit auf Körpertemperatur erwärmtem sterilem DPBS mit einem Druck von etwa 130 mmHg perfundiert, sodass das Blut verdrängt wurde und sich Leber und Niere entfärbten. Die Niere wurde freipräpariert und die Kapsel entfernt. Für die weitere Konservierung für anstehende Analysen wurde sie jeweils in drei Teile geteilt. Ein kleiner Nierenpol diente der mRNA-Expressionsanalyse, der mittlere Anteil der Histologie und der größte übrig gebliebene Anteil wurde zur durchflusszytometrischen Analyse verwendet.

2.3 Immunologische Methoden

2.3.1 Durchflusszytometrie

Allgemeines Funktionsprinzip

Die Durchflusszytometrie beschreibt ein Verfahren zur Untersuchung von Zellsuspensionen durch eine Quantifizierung und Charakterisierung der Zellen nach ihrer Größe, Granularität sowie Expression der Oberflächenantigene. Anders als die häufig als synonym verwendete `FACS´-Methode (Fluorescence Activated Cell Sorting) fehlt bei der Durchflusszytometrie die Möglichkeit, die Zellen zu sortieren.

Bei beiden Methoden fließen die Zellen mit einer Geschwindigkeit von 1200 Zellen/s mittels einer hydrodynamischen Fokussierung einzeln hintereinander durch einen Mikrokanal. Die perlschnurartige Zellsuspension durchläuft die Flusszelle, eine Messkammer, in der jede Zelle von einem Laser angestrahlt wird. Das von der einzelnen Zelle emittierte Licht wird durch in der Messzelle unterschiedlich angeordnete Photomultiplier detektiert. Der Laserstrahl wird abhängig von der Zellgröße oder -granularität mehr oder weniger gestreut. Das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) ist der Anteil des Laserlichts, der von den Zellen nicht gestreut und im ursprünglichen Strahlengang des Lasers detektiert wird. Das im FSC detektierte Lichtsignal ist daher ein Maß für die Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) stellt dagegen den gestreuten Anteil des Lichts dar und wird durch die Zellgranularität wie auch Größe und Struktur des Zellkerns beeinflusst (111).

Darüber hinaus können die Zellen durch Expression ihrer Oberflächenantigene oder intrazellulärer Antigene charakterisiert werden. Hierfür werden die entsprechenden Moleküle mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern markiert. Das Fluorochrom wird durch das Laserlicht angeregt und emittiert daraufhin Licht in einem Fluorochrom-spezifischen langwelligeren Bereich, das durch entsprechende abgestimmte Photomultiplier detektiert wird. Durch den Gebrauch mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe mit Emissionsspektren in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen können gleichzeitig mehrere unterschiedlich angefärbte Zellmarker untersucht werden. Dabei ist es wichtig, Fluoreszenzfarbstoffe auszuwählen, deren Emissionswellenlängen sich nach Möglichkeit wenig überlappen, sodass eine Unterscheidung zwischen den Signalen der detektierten Marker möglich ist. Trotzdem kann es zu Überlappungen der Emissionsspektren der verwendeten Fluorochrome kommen, sodass das Signal eines Farbstoffes in geringerem Maße auch in den detektierten benachbarten Emissionsbereich (Kanal) eines weiteren Fluorochroms einstrahlen kann. In solchen Fällen können diese einstrahlenden Signale durch entsprechende rechnerische Kompensation subtrahiert werden, um ansonsten entstehende falsch hohe Werte zu vermeiden. Zudem werden Isotypkontrollen als Negativkontrolle verwendet. Sie stellen Fluorochrom-gekoppelte Antikörper mit zum Detektionsantikörper identischem Isotyp dar, die gegen nicht in der Zellsuspension vorhandene Antigene gerichtet sind und zeigen somit das Ausmaß an unspezifischen Bindungen und Hintergrundsignal des Fluorochroms (111).

Für die Typisierung der Zellpopulation wurde für diese Arbeit das 4-Kanal-Gerät FACSCalibur (Becton Dickinson) genutzt, das neben der Erfassung des SSC- und FSC-Lichts durch entsprechend verbaute Photomultiplier die simultane Detektion von vier Zellantigenen erlaubt, die durch verschiedene Fluorochrome markierte Antikörper markiert werden. Die Auswertung erfolgte mit der entsprechenden CellQuest® Analyse-Software. Es konnten neben der Analyse der Gesamtzellpopulation auch Teilmengen durch sogenanntes Gating ausgewählt und weitere Analysen diese Subpopulation betreffend durchgeführt werden. Visualisiert wurden die Daten in Streudiagrammen.

Aufbereitung des Nierengewebes für durchflusszytometrische Untersuchungen

Um in der Niere als festes Gewebe eine durchflusszytometrische Untersuchung durchführen zu können, musste der Zellverband zunächst in eine Einzelzellsuspension überführt werden. Hierfür wurde die Niere wie oben beschrieben entnommen und ein Anteil von etwas mehr als ein Drittel des Organs für die folgende Aufarbeitung genutzt. Alle folgenden Schritte wurden, wenn nicht anders beschrieben gekühlt auf Eis durchgeführt.

Herstellung einer Einzelzellsuspension

Das Nierengewebe wurde in eine mit 3 ml eisgekühltem Paris-Puffer gefüllte Petrischale gegeben und mittels eines Skalpells mechanisch zerkleinert, sodass kleine Stücke von etwa 0,5 mm entstanden. Diese wurden in ein Falcon-Röhrchen überführt und Paris-Puffer bis zu einem Endvolumen von 11 ml hinzugefügt. Es folgte ein Zentrifugieren für 5 min (4°C, 260 g) und ein Abkippen des Überstands. Anschließend erfolgte ein Waschschritt mit 10 ml HBSS (eisgekühlt, mit Ca²⁺ und Mg²⁺). Nachfolgend wurden die Zellen in 5 ml einer Mischung aus Kollagenase A und DNase (auf 37°C vorgewärmt) für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Kollagenase bewirkte den Abbau von Kollagen im Bindegewebe und spaltete so enzymatisch den Zellverband, während die DNase eine Verklumpung durch austretende DNA lysierter Zellen verhindert. Nach Zentrifugieren für 5 min (4°C, 260 g) und dem Verwerfen des Überstands schloss sich ein weiterer Waschschritt mit 10 ml HBSS (eisgekühlt, mit Ca2+ und Mg2+) an. Danach wurde das Zellpellet in 5 ml 2 mM EDTA in HBSS (auf 37°C vorgewärmt, ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Dies diente der Inaktivierung verbliebener Kollagenase und Vermeidung von Calcium-abhängigen Zelladhäsionen. Die Zellsuspension wurde anschließend 5-minütig zentrifugiert (4°C, 30 g). Der Überstand mit Einzelzellen wurde in neue Falcon-Röhrchen abgekippt und auf Eis aufbewahrt. Das verbliebene Zellpellet wurde durch Gabe von 5 ml Kollagenase A (auf 37°C vorgewärmt) resuspensiert und erneut bei 37°C inkubiert. Nach 20 Minuten schloss sich eine abschließende mechanische Zelltrennung durch Ausspritzen der Zellsuspension an, was aus dem wiederholten Aufziehen der Zellsuspension in eine 10 ml Spritze und Abpressen durch zunächst 20G-Kanülen, mit einem Wechsel nach einigen Wiederholungen auf 26G-Kanülen bestand. Bei der letzten Wiederholung des Ausspritz-Vorganges wurden die Zellen in das Falcon-Röhrchen mit dem zuvor aufbewahrten Überstand überführt. Es folgte ein Zentrifugieren über 5 Minuten (4°C, 260 g), bevor der Überstand verworfen wurde. Ein Waschschritt mittels 10 ml eisgekühltem DPBS und anschließendem Zentrifugieren schloss sich an, gefolgt von Hinzugabe von 1 ml FACS-Puffer zum Zellpellet. Die Zellen wurden durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 70 µl gefiltert und der Filter mit 10 ml eisgekühltem DPBS nachgespült. Nach weiterem 5-minütigen Zentrifugieren (4°C, 260g) und Absaugen des Überstands erfolgte eine Resuspension der Zellen in FACS-Puffer.

Färbung

In FACS-Röhrchen wurden jeweils 100 µl Probensuspension und 10 µl einer Mischung aus Ratten-Serum (5 µl) und Maus-Serum (5 µl) zur Blockierung unspezifischer Bindungen gegeben. Anschließend wurden jeweils 1,4 µl eines jeden Fluorochrom-gekoppelten Antikörpers hinzugefügt und im Kühlschrank lichtgeschützt mindestens eine Stunde inkubiert. Die verwendeten Antikörper waren mit den Fluorochromen Fluorescein-5-isothiozyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Phycoerythrin-Cyanin 5 (PE.Cy5), Allophycocyanin (APC) sowie Alexa Fluor 488 (Alexa488) und Alexa Fluor 647 (Alexa647) markiert. Zur Bestimmung der Zellpopulationen wurden 4 verschiedene Ansätze zusammengestellt:

- 1. Ansatz: CD45-PE, CD3-Alexa488, CD4-Alexa647 und CD8-PE.Cy5
- 2. Ansatz: CD45-PE, F4/80-APC und CD11c-FITC
- 3. Ansatz: CD45-APC, CD11b-PE.Cy5, CD11c-PE und Ly6G-FITC
- 4. Ansatz: CD45-APC, CD11b-PE.Cy5, CD11c-PE und Ly6C-FITC

Nach der Inkubation wurden den Suspensionen jeweils 2 ml FACS-Puffer hinzugegeben, bevor sie für 5 Minuten zentrifugiert (4°C, 260 g) wurden. Nach Absaugen des Überstandes wurde dieser Waschschritt einmalig wiederholt. Abschließend wurde der Überstand so abgesaugt, sodass noch 300 µl der gefärbten Zellsuspension im FACS-Röhrchen verblieb. Vor der Messung wurden die Proben in einem Vortexmischer gemischt.

Für die Isotypkontrollen wurden einzelne Proben in gleicher Weise gefärbt, allerdings anstelle des spezifischen Fluorochrom-markierten Detektionsantikörpers der entsprechende Isotyp-Antikörper verwendet.

Analyse

Die Zellpopulationen wurden durch das Programm CellQuest® Analyse-Software ausgewertet. Anhand von Zellgröße und Granularität, sowie durch Detektion der verschiedenen Oberflächenmarker (Abbildung 17) konnten die folgenden renalen Leukozytenpopulationen wie folgt typisiert und quantifiziert werden:

Leukozyten	CD45+
T-Lymphozyten	CD45+, CD3+
CD4+ T-Lymphozyten	CD45+, CD3+, CD4+, CD8-
CD8+ T-Lymphozyten	CD45+, CD3+, CD4-, CD8+
Dendritische Zellen	CD45+, CD11c+
F4/80+ dendritische Zellen	CD45+, CD11c+, F4/80+
F4/80- dendritische Zellen	CD45+, CD11c+, F4/80-
Makrophagen	CD45+, CD11c-, F4/80+
Neutrophile Granulozyten	CD45+, CD11b+, Ly6G+
Inflammatorische Makrophagen	CD45+, CD11b+, Ly6C ^{high}

A Gating der CD4+ und CD8+ Leukozyten







${f C}$ Gating verschiedener Phagozytenpopulationen



${\sf D}$ Gating der inflammatorischen Phagozyten





Abbildung 17: Durchflusszytometrische Gatingstrategie zur Bestimmung der renalen Leukozytenpopulation

(A) Darstellung der CD45+ Leukozyten innerhalb der Gesamtnierenzellen (Diagramm ① unten links) mit anschließender Auftrennung in CD45+ CD3+ T-Lymphozyten (Diagramm ②, R3) und nachfolgend in CD4+ T-Lymphozyten (CD45+ CD3+ CD4+; Diagramm ③ oben links) und CD8+ T-Lymphozyten (CD45+ CD3+ CD3+ CD8+; Diagramm ③ unten rechts).

(B) Gatingstrategie zur Identifizierung verschiedener renaler monozytärer Phagozyten-Populationen (Diagramm ①, R2): F4/80- dendritische Zellen (CD45+, CD11c+, F4/80-; Diagramm ② oben links), F4/80+ dendritische Zellen (CD45+, CD11c+, F4/80+; Diagramm ③ oben rechts) und Makrophagen (CD45+, CD11c-, F4/80+; Diagramm ③ unten rechts)

(C) Charakterisierung der renalen Phagozytenpopulationen nach CD11c- und CD11b-Expressionsniveau (Diagramm ③), entsprechend Population R9 in Diagramm ②), nach Ausschluss Ly6G+ neutrophiler Granulozyten (Diagramm ②), R8) aus der CD45+ Leukozytenpopulation (Diagramm ①), R2). Dargestellt in Diagramm ③ sind die folgenden Phagozytenpopulationen: R3: CD11b^{high}CD11c^{high}, R4: CD11b^{high}CD11c^{low}, R5: CD11b^{int}CD11c^{int}, R6: CD11b^{low} CD11c^{high} und R7: CD11b^{low}CD11c^{int}.

(**D**) Bestimmung der Ly6C+ inflammatorischen Makrophagen aufgetrennt in die nach CD11c- und CD11b-Expression charakterisierten renalen Phagozytenpopulationen (Diagramm ③, entsprechend Population R9 aus Diagramm ②), nach Ausschluss der Ly6G+ neutrophilen Granulozyten (Diagramm ②, R8) aus der CD45+ Leukozytenpopulation (Diagramm ①, R2). Dargestellt sind die folgenden Phagozytenpopulationen: R3: CD11b^{high}CD11c^{high} (Diagramm ④), R4: CD11b^{high}CD11c^{low} (Diagramm ⑤), R5: CD11b^{int}CD11c^{int} (Diagramm ⑥), R6: CD11b^{low} CD11c^{high} (Diagramm ⑦) und R7: CD11b^{low}CD11c^{int} (Diagramm ⑧).

2.3.2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Allgemeines Funktionsprinzip

Der Begriff Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) beschreibt ein Antikörper-basiertes Nachweis- und Quantifizierungsverfahren, das basierend auf einer enzymatischen Farbreaktion unterschiedliche Moleküle in einer Probe, häufig Proteine, nachweist und quantifiziert. Das Grundprinzip der Methode basiert auf der spezifischen Bindung zwischen einem nachzuweisenden Antigen und seinem zugehörigen Antikörper (112, 113). In dieser Arbeit wurde die Sandwich-ELISA-Methode verwendet, dessen Name dadurch zustande kommt, dass zwei Antikörper, die

an zwei unterschiedlichen Epitopen des Antigens binden, eingesetzt werden. Die zwei Epitope sind eine Voraussetzung, damit die Antikörper nicht um eine Bindungsstelle konkurrieren. Der erste Antikörper (Capture-Antikörper) dient zur Bindung des in der untersuchten Probe enthaltenen Antigens an eine Mikrotiterplatte, während mit dem zweiten Enzym-gekoppelten Detektionsantikörper im nachfolgenden Schritt dann der spezifische Nachweis des gebundenen Antigens erfolgt.

Für dieses Verfahren wurde eine Mikrotiterplatte mit 96 Kammern genutzt. Diese wurde bereits am Vortag mit einem Gemisch aus Carbonatpuffer und dem ersten Antikörper (Capture Antikörper) beschichtet und abgedeckt über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde nach mehrmaligem Auswaschen (mit PBS/Tween) eine Blockierlösung aus bovinen Serumalbumin (BSA) zum Verhindern von unspezifischen Bindungen über 30 Minuten hinzugefügt. Es folgte ein weiterer Waschvorgang, bevor das Analysat mit einer Verdünnungsreihe auf die Mikrotiterplatte pipettiert wurde. Nach einer zweistündigen Inkubation wurden die Kammern ausgewaschen, um die nicht gebundenen Proteine zu entfernen und somit falsch positive Reaktionen zu verhindern. Nachfolgend wurde der zweite Antikörper (Detektionsantikörper), welcher mit Meerrettichperoxidase (engl. Horseradish Peroxidase, HRP) gekoppelt war, zugegeben und über 2 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte ein erneuter Waschschritt (mit PBS/Tween), um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Abschließend wurde Tetramethylbenzidin (TMB) als Substrat für das Reporterenzym HRP zugegeben, was nach katalytischer Spaltung einen Farbumschlag verursachte. Mit Hilfe von Schwefelsäure wurde die Reaktion gestoppt und eine photometrische Erfassung des gebildeten Farbstoffs in einem Photometer (ELISA-Reader) bei einer Wellenlänge von 450 nm angeschlossen. Das Lesegerät konnte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz die optische Dichte messen. Für einen quantitativen Nachweis wurde zeitgleich mit dem Analysat auch eine Verdünnungsreihe bekannter Konzentration als Standard aufgetragen, sodass eine Kalibrierungskurve erstellt werden konnte, wodurch sich die Antigen-Konzentration in der untersuchten Probe errechnen lässt.

Albumin-ELISA

Für die Bestimmung der Albuminkonzentration im Urin wurde eine Verdünnungsreihe um den Faktor 50, 10², 10³, 10⁴ angewandt und jeweils im Dreifachansatz auf die Platten aufgetragen. Die ursprüngliche Albuminkonzentration im Urin wurde später aus dem Mittelwert aller Messungen einer Probe berechnet. Da es sich bei den verwendeten Proben um Spontanurin handelte, erfolgte die Quantifizierung der Albuminurie mittels Albumin-Kreatinin-Quotient, um die unterschiedliche Konzentrierung des Urins zu normieren. Hierfür wurde aus den Urinproben zusätzlich die Kreatininkonzentration bestimmt und die Albuminkonzentration mit ihr ins Verhältnis gesetzt. Es wurde das Mouse Albumin ELISA Quantitation Kit (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA) verwendet.

Kreatinin-Bestimmung

Für die kolorimetrische Bestimmung der Kreatininkonzentration im Spontanurin wurde das Creatinine FS Kit (DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim) verwendet, welches auf der Jaffé- Methode basiert. Bei diesem kinetischen Farbtest bildet Kreatinin in einer alkalischen Umgebung mit Pikrinsäure einen gelb-orangen Komplex (Kreatininpinkrat-Komplex) (114). Die dadurch entstehende Extinktionsdifferenz zu festgelegten Zeiten ist proportional zur Kreatininkonzentration. Für die Bestimmung wurde die verdünnte Urinprobe im Zweifachansatz mit Natronlauge und Pikrinsäure versetzt. Der Photometer bestimmte die Extinktion bei einer Wellenlänge von 492 nm nach 1 und 3 Minuten. Mithilfe einer ebenfalls aufgetragenen Verdünnungsreihe eines Kreatininstandards konnte eine Standardkurve gebildet und die Kreatininkonzentration errechnet werden.

2.4 Histologische und immunhistochemische Methoden

2.4.1 Gewebeaufbereitung zur Herstellung lichtmikroskopischer Präparate

Am Versuchsendpunkt wurde jeweils ein mittlerer Abschnitt der Niere in Histologiekasetten gelegt und zur Verhinderung einer Strukturveränderung durch Autolyse über 24 Stunden in 4% Formalin bei 4°C fixiert. Am folgenden Tag wurde das Gewebe in Alkohol überführt. Zur Entwässerung wurde eine in der Konzentration aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) genutzt, bevor die Durchtränkung über das Intermediärmedium Xylol und das folgende Ersetzen durch heißes Paraffinwachs stattfand. Das eingebettete Gewebe befand sich am Ende in kleinen Paraffinquader, die eine ausreichende Festigkeit besaßen, um daraus mithilfe eines Mikrotoms dünne Schnitte von 2 µm Dicke anzufertigen. Die Schnitte wurden in einem 40°C temperierten Wasserbad aufgefangen und anschließend auf einem Objektträger aufgezogen. Die verwendeten Objektträger mussten zuvor zum Entfetten mit Aceton behandelt werden. Zudem wurden sie mit einer Ammoniumpersulfatlösung (5 ml APES in 245 ml Aceton) beschichtet, um eine bessere Haftung des Schnittes an den Objektträger zu gewährleisten. Zum Trocknen wurden die aufgezogenen Gewebeschnitte bei 60°C über die Nacht in den Trockenschrank gelegt.

Vor jeder Färbung musste das Paraffin mit Hilfe von Xylol von den Schnitten entfernt werden. Es folgte eine absteigende Alkoholreihe (100%, 96%, 70%) zur Rehydrierung und anschließende Spülung mit PBS.

2.4.2 Histopathologische Untersuchung

Periodic Acid-Schiff (PAS)-Färbung

Bei dieser Färbetechnik werden vor allem kohlenhydrathaltige Substanzen wie Glykogen, Glykoproteine oder Glykolipide angefärbt, welche im Bindegewebe, in der Basalmembran und in Zellwänden zu finden sind. Hierfür wurden im ersten Schritt 1,2-Glykolgruppen mit Hilfe der 0,5% Perjodsäure in Aldehydgruppen umgewandelt. Nach einem Waschvorgang lassen sich die Aldehydgruppen durch das Schiff-Reagenz magentarot anfärben. Mayers-Hämotoxylin dient zur Gegenfärbung der Zellkerne. Es erfolgt ein weiterer Waschvorgang und eine Dehydrierung durch eine aufsteigende Alkoholreihe. Zum Schluss wurde der Gewebeschnitt in das Eindeckmedium VectaMount eingebettet.

Zur Beurteilung einer glomerulären Schädigung durch Sklerosierung wurden Bilder von 50 Glomeruli pro Niere bei einer 400-fachen Vergrößerung aufgenommen. Mit dem Computerprogramm Photoshop erfolgte anschließend die Auswertung der glomerulären Größe anhand der Pixelzahl der Glomerulusquerschnitte, die in Relation zur Gesamtpixelzahl des aufgenommenen Bildes gesetzt wurde. Zudem wurde die mesangiale Matrixexpansion bestimmt. Hierfür wurde die PASpositive Glomerulusfläche in Relation zur glomerulären Querschnittsfläche bestimmt.

2.4.3 Immunhistochemische Färbung

Allgemeines Funktionsprinzip

Die Immunhistochemie stellt eine Methode dar, bei der eine Gewebeuntersuchung durch Anfärbung von Gewebestrukturen mit Antikörper-gekoppelten Farbstoffen oder Farbstoff-umsetzenden Enzymen durchgeführt wird. Die Färbung kann auf einem direkten oder indirekten Weg erfolgen. Während bei der direkten Methode nur ein direkt Farbstoff- oder Enzymgekoppelter Antikörper verwendet wird, gibt es bei der indirekten Methode einen primären Antikörper, der an das Gewebe bindet und einen sekundären Farbstoff-gekoppelten Antikörper, der an den Fc-Teil des Primärantikörpers bindet, wodurch es zu einer Signalverstärkung kommt.

Bei allen in dieser Arbeit verwendeten immunhistochemischen Färbungen wurde die spezielle Avidin-Biotin Methode angewendet. Diese Methodik basiert auf der sehr hohen Affinität zwischen den beiden Substanzen Avidin und Biotin. Ein primärer Antikörper bindet an die Zielstruktur im Gewebeschnitt, nachfolgend lagert sich ein mit Biotin konjungierter sekundärer Antikörper an dessen Fc-Teil an. Das hinzugegebene Avidin bindet an das Biotin des Sekundärantikörpers. Durch vorherige Kopplung des Avidins mit dem Enzym Peroxidase entsteht ein Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex, der das Gewebe nach Zugabe eines Farbsubstrats mit Hilfe einer durch Oxidation entstehenden Farbreaktion anfärbt. Zur Vermeidung von verfälschten Ergebnissen durch endogenes Biotin oder Peroxidase-Aktivität des untersuchten Gewebes werden die Gewebeschnitte mit Blockierlösungen vorbehandelt.

Färbung

Im ersten Schritt musste die endogene Peroxidaseaktivität durch eine Wasserstoffperoxidlösung (20 ml 30% H₂O₂ in 80 ml Methanol) blockiert werden, sodass später keine Reaktion mit dem Peroxidase-Farbsubstrat erfolgen konnte. Es folgte ein Waschvorgang mit PBS. Anschließend wurde eine Antigendemaskierung durchgeführt. Durch eine Behandlung der Gewebeschnitte mit einer in der Mikrowelle erhitzten Antigen-Unmasking-Lösung (3 ml Antigen-Unmasking-Lösung in 297 ml ddH₂O) oder alternativ einer in der Mikrowelle erhitzten Salzsäure und anschließender Autoklavierung für 10 Minuten bei 1 bar konnten die nachzuweisenden Antigene renaturiert und ihre immunogenen Epitope nach der Formalin-Fixierung für die Detektionsantikörper wieder zugänglich gemacht werden. Nach Abkühlung der Gewebeschnitte erfolgte ein weiterer Waschvorgang in PBS. Nachfolgend fand die Blockierung von endogenem Biotin durch Avidin statt. Nach einem erneuten Waschen mit PBS erfolgte eine Inkubation mit einer Magermilchlösung zur Vermeidung von falsch positiven Ergebnissen durch unspezifische Bindungen.

Für die Färbung wurde der primäre Antikörper zugegeben und nach Herstellerangaben inkubiert. Nach mehrfachen Waschschritten mittels PBS wurde der sekundäre Antikörper für eine Inkubationszeit von 30 Minuten aufgetragen und danach abgewaschen. Anschließend wurde das mit Peroxidase gekoppelte Avidin zugegeben. Es folgte ein weiterer Waschschritt mit TRIS-Puffer, bevor Wasserstoffperoxid als Peroxidasesubstrat sowie als Farbsubstrat die DAB-Lösung (3,3'-Diaminobenzidin) hinzugefügt wurden. Die von der Avidin-gekoppelten Peroxidase katalysierte Oxidation des Wasserstoffperoxids führt im Gegenzug zu einer Reduktion des 3,3'-Diaminobenzidin. Hierdurch bildet sich eine schwarze Färbung an den Zielstrukturen aus, deren Intensität mikroskopisch nachgeprüft wurde. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit Methylgrün gegengefärbt. Es folgten Waschschritte mit Alkohol und eine Einbettung der Gewebeschnitte in einem Tropfen VectaMount, bevor diese mit einem Deckglas verschlossen wurden.

Auswertung

F4/80-Färbung

Der primäre Antikörper Ratte anti-Maus F4/80 (auf den Schnitt mit einer Verdünnung von 1:100 aufgetragen) bindet an Makrophagen. Zur Quantifizierung der interstitiellen Makrophageninfiltration wurden pro Nierenschnitt in 100-facher Vergrößerung 10 Ausschnitte des Interstitiums aufgenommen. Mithilfe von Photoshop wurde der gefärbte Flächenanteil bestimmt. Der F4/80-Antikörper färbt histologisch keine glomerulären Makrophagenpopulationen an.

ER-H3-Färbung

Durch den Antikörper Ratte anti-Maus ER-HR3 (Verdünnung 1:100) können inflammatorische Makrophagen dargestellt werden. Für die Auswertung wurden in jeder Niere die markierten Zellen in 50 Glomeruli sowie in 10 Ausschnitten des Interstitiums in 400-facher Vergrößerung ausgezählt.

CD3-Färbung

Durch die Anfärbung von CD3 mittels des Ratte anti-Mensch CD3 Antikörpers (Verdünnung 1:100; kreuzregierend mit Maus-CD3) konnten T-Lymphozyten dargestellt werden. Es wurden je Niere 50 Glomeruli und 10 Ausschnitte des Interstitiums in 400-facher Vergrößerung ausgewertet, indem angefärbte Zellen ausgezählt wurden.

2.4.4 Immunfluoreszenzfärbung

Anders als bei der immunhistochemischen Färbung findet bei der Immunfluoreszenzfärbung keine Enzymreaktion statt. Zielstrukturen werden von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper gebunden und mit Hilfe einer Fluoreszenzlampe unter dem Lichtmikroskop sichtbar gemacht.

TUNEL-Methode

Die TUNEL-Methode (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT)-Mediated dUTP Nick End Labeling) ist eine hochsensitive Technik zum histologischen Nachweis von unterschiedlichen Zelltodformen, einschließlich Apoptose, Nekroptose und Nekrose. Beim Untergang von Zellen kommt es zu einer Fragmentierung von DNA-Strängen, wodurch an den Bruchenden Hydroxygruppen zugänglich werden. Diese werden durch die terminale Desoxynucleotid-Transferase (TdT) durch Anheften von Deoxyuridine-Triphosphat (dUTP) modifiziert. Durch Zugabe von Fluorochrom-markierten dUTP-Molekülen auf Gewebeschnitte können vorhandene DNA-Strangbrüche und damit absterbende Zellen fluoreszenzmikroskopisch im Gewebeschnitt detektiert werden. In dieser Arbeit wurde das In Situ Cell Death Detection-Kit (TUNEL-Kit) von Roche verwendet mit Vorgehen nach Herstellerangabe.

Auswertung der TUNEL-Färbung:

Je Nierenschnitt wurden 20 Glomeruli und 10 Ausschnitte des Interstitiums in 200-facher Vergrößerung ausgewertet, indem angefärbte Zellen ausgezählt wurden.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA erfolgte an einem RNase freien Arbeitsplatz. Es wurde der Purelink RNA Mini Kit (Ambion) nach Herstellerangaben verwendet. Hierzu wurde ein Nierenanteil bei der Gewebeisolation zum Schutz und Stabilisierung der RNA vor abbauender RNasen in RNA-Later transferiert und bei -20°C aufbewahrt. Für die RNA-Isolierung wurde das Nierengewebe aufgetaut. Nach Hinzugabe von 600 μ l mit 1% β -Mercaptoethanol versetztem RNA-Lyse-Puffer erfolgte eine Homogenisierung mit dem Ultra Turrax T25 (IKA), einen elektrischen Mixer. Es wurde 600 µl nichtvergälltes Ethanol hinzugegeben und gut gevortext, bevor das Homogenisat in Filtriersäulen transferiert wurde. Durch das nachfolgende Zentrifugieren (1200 g für 15 Sekunden) wurde die an die Matrix der Filtriersäule bindende RNA vom Gewebehomogenisat abgetrennt. Das aufgefangene Filtrat konnte verworfen werden. Es folgte ein Waschschritt mit 700 µl des Waschpuffers 1 mit anschließendem Zentrifugieren bei 1200 g für 15 Sekunden und Abgießen des Filtrats, um die RNA von Ethanol Rückständen zu reinigen. Nachfolgend wurden zwei weitere Waschvorgänge mit jeweils 500 µl Waschpuffer 2 mit anschließendem Zentrifugieren (1200 g für 15 Sekunden) und Verwerfen des Filtrats durchgeführt. Zum Trocknen wurden die Filtriersäulen mit gebundener RNA weitere 2 Minuten bei 12.000 g zentrifugiert, bevor das bisher verwendete Auffangröhrchen durch ein neues RNase freies Auffangröhrchen ersetzt wurde. Anschließend wurde 20 µl RNase freies Wasser mittig auf den Filter der Filtriersäule pipettiert und für 1 Minute zum Lösen der im Filter gebundenen RNA inkubiert. Nach Zentrifugieren (1200 g für 2 Minuten) wurde die im Wasser gelöste RNA im Auffangröhrchen entweder bei -80°C gelagert oder direkt in cDNA umgeschrieben.

2.5.2 Reinheits- und Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Reinheit der isolierten RNA wurde bestimmt, um zu entscheiden, ob die isolierte Probe für die weitere Analyse genutzt werden konnte. Nach Auftragen von 1 μ l Probe wurde mit einem Spektrophotometer (NanoDrop, Peqlab), die Extinktion bei $\lambda = 260$ nm (RNA/DNA) und $\lambda = 280$ nm (Protein) bestimmt. Der daraus berechnete Koeffizient 260/280 sollte keinen Wert kleiner als 1,8-2 aufzeigen. In diesen Fällen galt die Probe als kontaminiert mit Proteinen oder anderer aromatischer Substanzen und wurde somit entweder nochmals gewaschen oder verworfen.

Des Weiteren war es möglich, im selbigen Gerät die RNA-Konzentration zu bestimmen. Bei 260 nm entspricht eine optische Dichte von 1 (OD = 1) einer RNA-Konzentration von 40 ng/ μ l. Dementsprechend kann durch die Extinktion auf die Konzentration der Probe anhand nachfolgender Formel geschlussfolgert werden.

Konzentration [ng/µl] = E260 x Verdünnung x 40

2.5.3 Reverse Transkription der RNA zu cDNA

Um im nachfolgenden Schritt die PCR anwenden zu können, musste die isolierte RNA mittels reverser Transkription zuerst in cDNA umgeschrieben werden. Hierfür wurde die RNA zunächst linearisiert, indem die Probe für 5 Minuten auf 65°C erhitzt und anschließend schlagartig in Eis abgekühlt wurde. Auch die nachfolgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Damit bei allen Proben jeweils die gleiche Menge cDNA synthetisiert wurde, musste die isolierte RNA mit RNase-

freiem Wasser so verdünnt werden, dass in 15 µl jeweils 2 µg RNA gelöst war. Die verdünnte Probe wurde daraufhin mit einer Reagenzmischung (Master Mix) versetzt und durch den Vortexmischer gut geschüttelt. Die verwendete Reagenzmischung setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

Volumen	
4,5 μl	5x First Strand Buffer
0,45 μl	25 mM dNTP-Mischung
1 μl	0,1 M DTT
0,5 μl	40 U/μl RNasin
0,25 μl	Hexanukleotide
0,25 µl	Acrylamid 15 μg/ml
0,5 µl	Superscript II (Reverse Transkriptase)

|--|

Das Endvolumen von 22,45 µl, welches zusammengesetzt war aus 15 µl verdünnter RNA und 7,45 µl des Master Mix wurde im Thermomixer bei 42°C für 90 Minuten unter Schütteln bei 350 RPM inkubiert. Am Ende wurde die cDNA-Synthesereaktion durch 5-minütiges Erhitzen des Gemisches auf 85°C gestoppt. Die stabilere cDNA konnte bei -20°C gelagert werden.

2.5.4 Quantitative Real Time-PCR

Allgemeines Funktionsprinzip

Mit Polymerase-Kettenreaktion bzw. englisch Polymerase Chain Reaction (PCR) wird ein Verfahren zur Vervielfältigung von spezifischen DNA-Sequenzen bezeichnet. Die Voraussetzung hierfür ist die Kenntnis über die Sequenz des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts, an denen die zwei Primer, welche komplementäre Oligonukleotide darstellen, ansetzen können, um den Start- und Endpunkt des zu amplifizierenden Genabschnittes festzulegen. Zudem wird das Enzym DNA-Polymerase benötigt, welches die Reaktion katalysiert, wie auch Desoxyribonukleosidtriphosphate als Bausteine für die Synthese neuer DNA-Stränge. Der Ablauf der PCR besteht aus mehreren sich immer wiederholenden Zyklen bei der jeweils drei Schritte durchlaufen werden, nämlich die Denaturierung des vorliegenden DNA-Doppelstrangs, Annealing der Primer an die Einzelstränge und die eigentliche Amplifikation mit Synthese neuer Komplementärstränge. Bei der Denaturierung wird die DNA auf 95°C erhitzt, sodass bei der doppelsträngigen DNA die verbindenden Wasserstoffbrücken gespalten werden, wodurch die DNA letztendlich einzelsträngig vorliegt. In der Annealing-Phase wird die Probe auf 60°C abgekühlt und es findet die Primerhybridisierung statt. Beide Primer binden an das 3'Ende, sodass der Forward-Primer den Start und der Reverse-Primer das Ende der Sequenz festlegen. Für die Amplifikation wird die Temperatur auf 72°C gesetzt, sodass die Polymerase bei ihrem Arbeitsoptimum ausgehend vom gebundenen Primer durch Einbau der Desoxyribonukleosidtriphosphate den komplementären Strang zur vorliegenden einzelsträngigen DNA synthetisiert. Es entsteht eine doppelsträngige DNA, die im nächsten

Schritt wieder denaturiert wird. Nach Ablauf eines jeden Zyklus wird damit die Zielsequenz verdoppelt, sodass durch die exponentielle Amplifizierung bereits kleinste Mengen der DNA soweit vervielfältigt wird, dass sie quantitativ nachweisbar werden.

Bei der Real Time-PCR erfolgt neben der Amplifikation der Gensequenz zusätzlich eine in Echtzeit verlaufende photometrische Messung zur Quantifizierung der gebildeten Zielsequenz. Dies gelingt z.B. durch Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green, einem interkalierenden Farbstoff, der sich in doppelsträngige DNA einlagert und bei Komplexbildung ein intensives Fluoreszenzsignal abgibt (115). Durch die proportional ansteigende Intensität der Fluoreszenz zur neu amplifizierten doppelsträngigen DNA kann auf die synthetisierte DNA-Menge rückgeschlossen werden.

Im Verlauf der Amplifikation wird der Cycle Threshold (CT)-Wert bestimmt, der die Zyklusanzahl angibt, bei der sich das Fluoreszenzsignal deutlich vom Hintergrund abhebt. Folglich müssen bei einer hohen eingesetzten cDNA-Menge weniger Zyklen durchlaufen werden, bis dieser Schwellenwert erreicht wird und es wird ein kleinerer CT-Wert gemessen. Da die in der Probe vorhandene cDNA-Menge proportional zum ursprünglichen RNA-Gehalt vor reverser Transkription ist, spiegelt der CT-Wert die Menge ursprünglich vorhandener RNA wie mRNA eines untersuchten Gens oder ribosomale RNA in der Gewebeprobe wider. Für die Vergleichbarkeit der Proben mit unterschiedlicher Gewebemenge und damit mRNA-Gehalt erfolgt eine relative Quantifizierung, bei der der CT-Wert der Zielsequenz in Verhältnis zu einer Referenzsequenz gesetzt wird. Für die Referenzsequenz wird ein konstitutiv exprimiertes, in seinem Expressionsniveau nur von der vorliegenden Gewebemenge beeinflusstes Gen (engl. Housekeeping Gene) wie ribosomale 18S RNA oder Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mRNA genutzt, welches unabhängig von Genotyp sowie weiteren Einflüssen vorhanden ist.

Zusätzlich wird am Ende der PCR-Reaktion eine Schmelzkurvenanalyse für die Bestimmung der Spezifität der Amplifikation durchgeführt. Hierfür wird die DNA von 60°C schrittweise auf 97°C erhitzt. Hierbei wird die doppelsträngige DNA gespalten, wodurch der interkalierende Farbstoff freigesetzt wird und die Fluoreszenzintensität schlagartig abfällt. Dabei lösen sich die Doppelstränge bei unspezifischen PCR-Produkten (z.B. Primer-Dimere) früher als bei spezifischen Amplifikationsprodukten (Primer mit cDNA). Idealerweise sollte nur ein Peak dieser Schmelzkurve zu verzeichnen sein. Sollte bei dieser Analyse mehr als ein Schmelzpunkt detektiert werden, würde es bedeuten, dass bei der Messung nicht nur die Zielsequenz, sondern noch weitere Produkte mitgemessen wurden. Die Messwerte wären damit ungenau, sodass das Ergebnis dieser PCR-Analyse verworfen würde.

	Dauer (in Minuten)	Temperatur (in °C)		
Vorabdenaturierung	5	95		
Denaturierung	0,25	95		
Hybridisierung	0,75	60	40x Wiederholungen	
Extension	0,5	72		
Schmelzkurve	0,17	95		
	5	60-97	schrittweises Ansteigen	

Tabelle 14: Einstellungsparameter für die Durchführung der Real-Time-PCR zur mRNA-Expressionsanalyse

Vorgang

Zunächst wurde die cDNA zu einem Verhältnis von 1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnt bevor jeweils 2 µl der verdünnten cDNA mit 18 µl des PCR-Mixes gemischt wurde. Der PCR-Mix setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

Volumen:				
10 µl	Mastermix mit SYBR Green			
0,6 µl	forward Primer			
0,6 µl	reverse Primer			
0,16 µl	Taq-Polymerase			
6,64 µl	RNase-freies Wasser			

Tabelle	15. Ansatz i	nit Real-Time	PCR Prin	her für die	Expressionsan	alvse
I GROUID		Int iteat inte			Expredenteriouni	u , 00

Das Gesamtvolumen von 20 µl wurde in 96-Well Lightcycler-Platten pipettiert. Neben der Probe wurde jeweils eine Negativkontrolle für jeden Primer durchgeführt, bei der anstatt der 2 µl cDNA-Probe 2 µl RNase-freies Wasser hinzugegeben wurde. Anschließend wurde die Platte mit einer optisch klaren Klebefolie abgedichtet und für 2 min bei 3000 g zentrifugiert. Für die Amplifizierung und Messung wurde bei dieser Arbeit der Lightcycler 480 von Roche sowie das zugehörige Computerprogramm LightCycler Software 480 Version 1.5.0.39 (Roche) genutzt. Als Housekeeping-Gen kam sowohl die ribosomale 18S RNA wie auch GAPDH zum Einsatz.

In der Auswertung wurden keine Absolutwerte angegeben, sondern die relativen Anteile einer Zielsequenz im Verhältnis zum Housekeeping-Gen wurden in allen Gruppen bestimmt und die jeweiligen Ergebnisse der einzelnen Versuchstiergruppen in Relation zum Wildtyp (WT=1) gesetzt.

2.6 Statistische Analysen

Die Auswertung der in dieser Arbeit gewonnenen Daten wurde anhand der Computerprogramme Microsoft Excel oder Graphpad Prism durchgeführt. Die durch Graphiken dargestellten Ergebnisse geben sowohl die Mittelwerte wie auch die Einzelwerte aller Versuchstiere einer Versuchsgruppe an. Für die Darstellung der jeweiligen Standardfehler der Mittelwerte (Standard error of the mean, SEM) wurden Fehlerbalken eingezeichnet.

Für die Varianzanalyse zum Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde das statistische Analyseverfahren ANOVA (Analysis of Variance) als Erweiterung des t-Tests angewendet. Bei einem signifikanten Ergebnis im ANOVA-Test wurde im Anschluss ein Post hoc-Test durchgeführt, mittels dem Dunnett-Test (paarweiser Vergleich mit einer Kontrollgruppe) bzw. dem Tukey-Test (paarweiser Gruppenvergleich).

Bei einem Signifikanzniveau mit einem p-Wert von < 0,05 wurde von einem statistisch signifikanten Unterschied ausgegangen. Diese Werte werden im Fließtext als *statistisch signifikant* oder *signifikanter Unterschied* beschrieben. In den Abbildungen werden statistisch signifikante Unterschiede durch Sternmarkierungen nach folgendem Schema gekennzeichnet:

- * p-Wert < 0,05
- ** p-Wert < 0,01
- *** p-Wert < 0,001
- **** p-Wert < 0,0001.
3. Ergebnisse

3.1 Verlauf der diabetischen Nephropathie in Ripk1kd-, Ripk3kd- und Mlkl-/- Mäusen im Vergleich zum Wildtyp

Gemäß der dieser Arbeit zugrundeliegenden Hypothese einer Beteiligung der Nekroptose an der renalen Schädigung bei diabetischer Nephropathie wurde den Mäusen der unterschiedlichen Phänotypen Ripk1kd, Ripk3kd und Mlkl-/- ein Diabetes durch die Injektion von STZ induziert (siehe Kapitel 2.2.7). Zur Aggravierung des Nierenschadens bei der chronischen Erkrankung wurde zuvor eine unilaterale Nephrektomie durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.6).

3.1.1 Der Erfolg der Diabetesinduktion

Der wöchentlich bestimmte Blutglukosewert (Abbildung 18A) zeigte in den ersten Wochen in allen Genotypen im Mittel einen deutlichen Anstieg, bei dem zum Versuchsende hin (Woche 25) Durchschnittswerte über 380 mg/dl erreicht wurden (Abbildung 18B). Allerdings fiel auf, dass Ripk1kd-Mäuse mit 386 mg/dl im Vergleich zum Wildtyp mit 598 mg/dl signifikant niedrigere Blutzuckermittelwerte aufwiesen.





(A) bei wöchentlicher Bestimmung im Verlauf von 25 Wochen, (B) zum Versuchsendpunkt in Woche 25. Im Vergleich zum Wildtyp (598 mg/dl) wiesen Ripk1kd-Mäuse (386 mg/dl) zum Versuchsendpunkt einen geringeren Blutglukosewert auf. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± SEM aller Versuchstiere mit Überleben bis zum Versuchsendpunkt, n = 8 bis 12 je Gruppe.

Am Versuchsendpunkt in Woche 25 wurden schließlich Plasmaglukosewerte und die jeweiligen HbA1c-Werte bestimmt (Abbildung 19). Im Vergleich zum Wildtyp (793 mg/dl) wiesen Ripk1kd-Mäuse (410 mg/dl) zum Versuchsendpunkt einen geringeren Plasmaglukosespiegel auf, bei vergleichbaren HbA1c-Werten.



Abbildung 19: Plasmaglukose und HbA1c-Wert zum Versuchsendpunkt (Woche 25) im Vergleich zwischen Wildtyp (WT)-, Ripk1kd-, Ripk3kd- und Mlkl-/- Mäusen

Im Vergleich zum Wildtyp (793 mg/dl) wiesen Ripk1kd-Mäuse (410 mg/dl) zum Versuchsendpunkt einen geringeren Plasmaglukosespiegel auf, bei vergleichbaren HbA1c-Werten. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM aller Versuchstiere mit Überleben bis zum Versuchsendpunkt, n = 8 bis 12 je Gruppe.

Nur bei Versuchstieren mit einem HbA1c > 5,0% am Versuchsendpunkt in Woche 25 wurde von einer erfolgreichen Diabetes-Induktion mit ausreichender hyperglykämischen Stoffwechsellage ausgegangen, der zur diabetischen Nierenschädigung führt. Daher wurden nur diese Versuchstiere in die folgenden Auswertungen eingeschlossen. Abbildungen 20 und 21 verdeutlichen dementsprechend den Verlauf der Blutglukosewerte bzw. Plasmaglukose und HbA1c-Wert am Versuchsende von Wildtyp-, Ripk1kd-, Ripk3kd- und Mlkl-/- Mäusen mit entsprechend obiger Definition erfolgreicher Diabetes-Induktion. Die Daten zeigen, dass bei den jetzt ausgewerteten Versuchstieren die hyperglykäme Stoffwechsellage in allen Genotypen vergleichbar war. Lediglich Ripk1kd-Mäuse wiesen im Vergleich zum Wildtyp am Versuchsende geringere Plasmaglukosespiegel auf, die gemessenen Blutglukosewerte im Verlauf und der HbA1c-Wert als Langzeitmaß für die zurückliegende hyperglykäme Stoffwechsellage waren jedoch vergleichbar.





(A) bei wöchentlicher Bestimmung im Verlauf von 25 Wochen, (B) zum Versuchsendpunkt in Woche 25. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM aller Versuchstiere mit einer erfolgreichen Diabetesinduktion mit Überleben bis zum Versuchsendpunkt, n = 5 bis 10 je Gruppe.



Abbildung 21: Plasmaglukose und HbA1c-Wert zum Versuchsendpunkt (Woche 25) im Vergleich zwischen Wildtyp (WT)-, Ripk1kd-, Ripk3kd- und Mlkl-/- Mäusen

Alle in die weiteren Auswertungen aufgenommenen Versuchstiere wiesen zum Versuchsendpunkt eine deutliche Hyperglykämie > 500 mg/dl und einen HbA1c > 5,0% auf. Im Vergleich zum Wildtyp (793 mg/dl) wiesen Ripk1kd-Mäuse (639 mg/dl) zum Versuchsendpunkt einen geringeren Plasmaglukosespiegel auf, bei vergleichbaren HbA1c-Werten. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM aller Versuchstiere mit einer erfolgreichen Diabetesinduktion und Überleben bis zum Versuchsendpunkt, n = 5 bis 10 je Gruppe.

Bei Auswertung der Erfolgsrate der Diabetesinduktion fiel auf, dass sich bei allen STZ-injizierten Wildtyp-Mäusen ein Diabetes ausbildete, während sich bei den transgenen Mäusen nur teilweise eine diabetische Stoffwechsellage entwickelte. Vor allem bei den Mlkl-/- Versuchstieren ließ sich initial nach fünf STZ-Injektionen nur bei 41,7% ein Diabetes induzieren. Deshalb wurde bei diesem Genotyp bei nachfolgenden Versuchsreihen in der zweiten Woche die fünftägige STZ-Injektion nach gleichem Protokoll nochmals wiederholt, sodass schließlich 9 von 12 Mäusen (75%) ein Diabetes aufwiesen. Bei Ripk1kd-Mäusen lag die Erfolgsrate bei 50%, in Ripk3kd-Tieren bei 76,9% (Abbildung 22). Diese Daten legen nahe, dass dem toxischen Effekt von STZ auf die ß-Zellen des Pankreas zum Teil eine vor allem Ripk1kd- und Mlkl-/- abhängige Nekroptose zugrunde liegen könnte.



Abbildung 22: Prozentuale Erfolgsrate der Diabetesinduktion nach fünf Streptozotocin-Injektionen im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT), Ripk1kd, Ripk3kd und MIkI-/-

Während die Diabetesinduktion im Wildtyp (WT) zu 100% erfolgreich verlief, wiesen bis zum Versuchsendpunkt nur 50% der Ripk1kd- und 77% der Ripk3kd-Versuchstiere nach den ersten fünf STZ-Gaben eine diabetische Stoffwechsellage auf. Bei den Mlkl-/- Mäusen zeigte sich in der ersten Woche nach den ersten fünf STZ-Gaben nur bei 42% ein Anstieg des Blutzuckers, sodass in späteren Versuchsreihen in der zweiten Woche die fünftägige STZ-Injektion nach selbigem Protokoll nochmals wiederholt wurde. Die Daten repräsentieren die Werte aller bis zum Versuchsendpunkt überlebenden Versuchstiere, n = 8 bis 12 je Gruppe.

3.1.2 Mortalität und Gewichtsverlauf

Über den Versuchszeitraum von 25 Wochen nach Diabetesinduktion mussten einige, am ehesten in Folge der hyperglykämen Stoffwechsellage moribunde Versuchstiere, vor allem ab Woche 12 euthanasiert werden. Diese Sterblichkeit betrug bei den diabetischen Wildtyp-Tieren 33,3%, bei den Ripk1kd-Mäusen 28,6% und bei den Mlkl-/- Mäusen 10%. Ripk3kd-Tiere wiesen im Versuchszeitraum keine Mortalität auf. Zwischen der Mortalität der vier Genotypen bestand jedoch kein signifikanter Unterschied (Log-Rank P = 0,189) (Abbildung 23).



Abbildung 23: Mortalität im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT), Ripk1kd, Ripk3kd und Mlkl-/-

Überlebenskurven mit Beginn bei der ersten Streptozotocin-Gabe an Tag 0 bis zur Woche 25. Beim Wildtyp (WT) mussten von initial 12 Mäusen vier Versuchstiere in Woche 12, 14, 18, 22 euthanasiert werden, während es in der Ripk1kd-Gruppe (initial n = 7) zwei Tiere in der Woche 4 und 17 waren. Von den Ripk3kd-Mäusen überlebte die gesamte Gruppe (n = 10), während von den Mlkl-/- Versuchstieren (initial n = 10) eines in der 13. Woche euthanasiert wurde. Die Daten repräsentieren die Werte aller Versuchstiere mit erfolgreicher Diabetesinduktion, n = 7 bis 12 je Gruppe.

Die Erfassung des Gewichtsverlaufs (Abbildung 24A) zur Mitbeurteilung des gesundheitlichen Zustands der Tiere zeigte, dass das Körpergewicht nach der STZ-Injektion in Woche 0 in Wildtypund MIkl-/- Mäusen leicht absank, bevor es sich im weiteren Verlauf stabilisierte. Bei den Ripk1kdund Ripk3kd-Versuchstieren kam es im Versuchszeitraum zu einer kontinuierlichen Zunahme des Körpergewichts. Das Körpergewicht zum Versuchsende war daher in der Ripk1kd- und Ripk3kd-Versuchsgruppe signifikant höher als im Wildtyp (Abbildung 24B). Bei gleicher diabetischer Stoffwechsellage schienen daher Ripk1kd- und Ripk3kd-Mäuse metabolisch die induzierte Hyperglykämie besser als Wildtyp-Tiere zu tolerieren.



Abbildung 24: Körpergewicht im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT), Ripk1kd, Ripk3kd und Mlkl-/-

(A) bei wöchentlicher Bestimmung im Verlauf von 25 Wochen, (B) zum Versuchsendpunkt in Woche 25. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM aller Versuchstiere mit einer erfolgreichen Diabetesinduktion und Überleben bis zum Versuchsendpunkt, n = 5 bis 10 je Gruppe.

3.1.3 Funktionelle Nierenparameter

Glomeruläre Filtrationsrate

Zur Untersuchung der Hyperglykämie-induzierten renalen Schädigung wurden zunächst die funktionellen Nierenparameter bestimmt. Hierzu zählten zum einen die transkutane Messung der glomerulären Filtrationsrate als einer der wichtigsten Marker zur Bestimmung der Nierenfunktion. Diese wurde in Woche 23, das heißt 2 Wochen vor der Gewebegewinnung am Versuchsendpunkt durchgeführt. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Tendenziell war jedoch der Durchschnittswert der Wildtyp-Mäuse mit 175,5 µl/min verglichen mit den Ripk1kd- (186,0 µl/min), den Ripk3kd- (222,6 µl/min) und den Mlkl-/- Versuchstieren (185,44 µl/min) leicht vermindert (Abbildung 25A).

Albuminurie

Als Weiteres wurde die Albuminurie untersucht (Abbildung 25B). Bei einer glomerulären Schädigung kommt es zu einem Funktionsverlust der Filtrationsbarriere. Hierdurch können vermehrt Proteine wie Albumin in das Ultrafiltrat übertreten. Für die Untersuchung wurde ein ELISA aus Spontanurin der Versuchstiere zum Versuchsendpunkt angewandt. Aufgrund der unterschiedlichen Konzentrierung des Spontanurins bei den verschiedenen Versuchstieren erfolgte eine Normierung durch eine zusätzliche Kreatininbestimmung und einen aus beiden Werten gebildeten Albumin/Kreatinin-Quotienten. Die Albuminurie fiel mit 149,1 µg/mg Kreatinin bei den Wildtyp-Tieren tendenziell am stärksten und bei den Mlkl-/- Versuchstieren mit 16,7 µg/mg Kreatinin am schwächsten aus. Die Durchschnittswerte der Ripk1kd- und Ripk3kd-Mäusen lagen bei 97,0 µg/mg Kreatinin bzw. 122,0 µg/mg Kreatinin. Allerdings ergaben sich im Vergleich aller vier Genotypen keine signifikanten Unterschiede im Ausmaß der Albuminurie.

Blutanalyse

Die renale Schädigung ist auch durch Verlust der exkretorischen Funktion der Niere charakterisiert. Dies führt zu einer reduzierten Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen und Retentionsparameter wie Harnstoff steigen an. Daher erfolgte zum Versuchsendpunkt eine Blutentnahme zur Bestimmung des Plasmaharnstoffs. Die Plasmaharnstoffwerte der Wildtyp-Versuchstiere lagen mit 115,9 mg/dl tendenziell über den Werten der transgenen Ripk1kd- (98,8 mg/dl), Ripk3kd-(109,2 mg/dl), und Mlkl-/- Mäuse (106,8 mg/dl), allerdings ergab sich auch hier kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (Abbildung 25C).

Weitere Plasmaanalysen zur Untersuchung einer nephrotischen Befundkonstellation wurden durchgeführt. Bei einem diabetischen Grundleiden kann es durch fortschreitende glomeruläre Vernarbung zu einer ausgeprägteren Störung der Filtrationsbarriere bis zur Ausbildung eines nephrotischen Syndroms kommen. Dieses ist charakterisiert durch Proteinurie, Hypoalbumin- und Hypoproteinämie, einer reaktiv entstehenden Hyperlipoproteinämie, sowie peripheren Ödemen. Zur Analyse wurden aus den Plasmaproben daher das Albumin und Gesamtprotein bestimmt. Es zeigte sich eine signifikante stärkere Hypoalbuminämie (p = 0,0129) bei den Wildtyp-Mäusen (2,0 g/dl) im Vergleich zu den Mlkl-/- Versuchstieren (2,4 g/dl) bei vergleichbaren Gesamtproteinwerten (Abbildung 25D).

Des Weiteren wurden die Plasmalipide Cholesterin und Triglyceride bestimmt, wobei die Plasmacholesterinwerte der Ripk1kd- (69,4 mg/dl) und Mlkl-/- Tiere (62,9 mg/dl) im Vergleich zur Wildtyp-Population (87,5 mg/dl) signifikant erniedrigt waren (p = 0,033 und p < 0,0001). Bei den Plasmatriglyceridwerten ergaben sich dagegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Genotypen (Abbildung 25E).

Zusammenfassend zeigen die erhobenen funktionellen Daten, dass diabetische Ripk1kd-, Ripk3kd- und Mlkl-/- Mäuse im Vergleich zum Wildtyp im Verlauf der diabetischen Nierenschädigung bei vergleichbarer GFR und Plasmaharnstoffwerte aller Genotypen keine signifikanten Unterschiede ihrer Nierenfunktion aufwiesen. Auch die Albuminurie am Ende des Versuchszeitraums als funktionelles Maß der glomerulären Schädigung war bei allen vier untersuchten Genotypen vergleichbar. Die im Vergleich zum Wildtyp in Mlkl-defizienten Mäusen signifikant verminderte Hypoalbuminämie mit, wie auch bei Ripk1kd-Mäusen, verringerter Hypercholesterinämie könnte jedoch auf eine geringere Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere in diesen beiden Genotypen hinweisen.



D



Plasmaprotein Protein (g/dl) 2 0 Ripk¹kd

Ripkako

N.

MINIT

Ε



Abbildung 25: Funktionelle Nierenparameter zum Versuchsendpunkt im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT), Ripk1kd, Ripk3kd und Mlkl-/-

(A) Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) nach transkutaner Bestimmung durch die renale FITC-Sinistrin Elimination in Woche 23, (B) Albuminurie im Spontanurin am Versuchsendpunkt, ausgedrückt als Albumin/ Kreatinin-Quotient, (C) Plasmaharnstoff als Retentionsparameter, (D) Plasmaalbumin und Gesamtprotein,
 (E) Plasmacholesterin und Triglyceride am Versuchsendpunkt. Die Entnahme der Plasmaproben erfolgte zum Versuchsendpunkt in Woche 25. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± SEM aller Versuchstiere mit einer erfolgreichen Diabetesinduktion und Überleben bis zum Versuchsendpunkt, n = 5 bis 10 je Gruppe.

3.1.4 Struktureller Schaden

Nachdem die funktionellen Nierenparameter lediglich tendenziell für eine leichte Verbesserung der diabetischen Nierenschädigung vor allem in Mlkl-/- Mäusen sprachen, wurde überprüft, ob die untersuchten Genotypen Unterschiede im strukturellen renalen Schaden aufwiesen. Hierzu wurde das am Versuchsendpunkt entnommene Nierengewebe nach PAS-Färbung histologisch untersucht. Die diabetische Nephropathie ist infolge der bestehenden Hyperfiltration und zellulären Hyperplasie durch eine Größenzunahme der Glomeruli sowie durch eine Expansion der mesangialen Matrix charakterisiert. Aus diesem Grund wurde zum einen die glomeruläre Querschnittsfläche (ausgedrückt als Relation der glomerulären Pixelzahl/Pixelzahl des Gesamtbilds) bestimmt, zum anderen wurde die mesangiale Matrixexpansion als Flächenanteil der Matrix in Bezug zur glomerulären Gesamtfläche berechnet. Verglichen mit dem Wildtyp (0,186) wiesen die Mlkl-/- Mäuse (0,139) einen signifikant geringeren Glomerulusquerschnitt auf (p = 0,0020). Der Glomerulusquerschnitt der Ripk1kd- (0,206) und Ripk3kd-Versuchstiere (0,195) unterschied sich dagegen nicht signifikant von den Wildtyp-Tieren (Abbildung 26A). Die Untersuchung der mesangialen Matrix ergab eine tendenziell verminderte Matrixexpansion in den transgenen Versuchsgruppen Ripk1kd (0,080), Ripk3kd (0,081) und Mlkl-/- (0,090) im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (0,096). Allerdings waren diese Unterschiede statistisch nicht signifikant (Abbildung 26B).

Zusammengefasst weist die histologische Beurteilung des renalen Gewebeschadens daher insbesondere in diabetischen Mlkl-/- Mäusen auf eine geringere glomeruläre Schädigung im Vergleich zum Wildtyp hin. Dies korreliert mit der signifikant verminderten Hypoalbuminämie und verringerten Hypercholesterinämie der Mlkl-defizienten Mäuse am Versuchsendpunkt, und ihrer zumindest tendenziell geringeren Albuminurie im Vergleich zum Wildtyp.





Der Vergleich des strukturellen Schadens erfolgte anhand PAS-gefärbter histologischer Schnitte aus dem zum Versuchsendpunkt entnommenen Nierengewebes. (A) Auswertung der glomerulären Größe durch Erfassung der Pixelzahl der Glomerulusquerschnitte bei 400-facher Vergrößerung in Relation zur Pixelzahl des Gesamtbildes. (B) Mesangiale Matrixexpansion, bestimmt als Anteil der PAS-positiven Glomerulusfläche in Relation zum glomerulären Gesamtquerschnitt. (C) Histologische Aufnahme repräsentativer Glomeruli. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM aller Versuchstiere mit einer erfolgreichen Diabetesinduktion und Überleben bis zum Versuchsendpunkt, n = 5 bis 10 je Gruppe.

3.1.5 Renaler Zelltod

Um zu untersuchen, inwieweit in den vier Genotypen die renale Schädigung bei chronischer diabetischer Stoffwechsellage mit einem unterschiedlichen Ausmaß an renalem Zelltod einhergeht, wurden absterbende Zellen im Nierengewebe quantifiziert. Hierfür wurden histologische Schnitte des am Versuchsendpunkt entnommenen Nierengewebes mittels TUNEL-Färbung angefärbt. Die angefärbten Zellen im Glomerulus und Interstitium wurden anschließend fluoreszenzmikroskopisch quantifiziert.

Glomerulär zeigten sich in der Analyse zwischen Wildtyp-Tieren (0,14 Zellen/Glomerulus), Ripk1kd- (0,20 Zellen/Glomerulus), Ripk3kd- (0,18 Zellen/Glomerulus) und Mlkl-/- Mäusen (0,13 Zellen/Glomerulus) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Abbildung 27A). Auch konnte bei der Zählung im Interstitium keine signifikant unterschiedliche Zahl nekrotischer Nierenzellen in den untersuchten Genotypen nachgewiesen werden, mit etwa 0,7 nekrotischen Zellen/Gesichtsfeld in Wildtyp-, Ripk3kd- und Mlkl-/- Mäusen sowie 0,42 Zellen/Gesichtsfeld in der Ripk1kd-Versuchsgruppe (Abbildung 27B).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Fehlen der Kinaseaktivität von Ripk1 und Ripk3, oder eine Mlkl-Defizienz im Verlauf der diabetischen Nierenschädigung das Ausmaß des renalen Zelltods nicht beeinflusst. Insbesondere ergeben die Daten keine Hinweise auf einen vermindert ablaufenden Zelltod, unter anderem durch Nekroptose in den transgenen Mäusen.



Abbildung 27: Evaluation des renalen Zelltods im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT), Ripk1kd, Ripk3kd und Mlkl-/-

Die Quantifizierung nekrotischer Zellen erfolgte mittels TUNEL-Färbung histologischer Schnitte aus dem zum Versuchsendpunkt entnommenen Nierengewebes. (A) Glomerulärer Zelltod, (B) Tubulointerstitieller Zelltod, (C) Repräsentative TUNEL-gefärbte Nierenschnitte unter Fluoreszenzlicht, 200-fache Vergrößerung. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM aller Versuchstiere mit einer erfolgreichen Diabetesinduktion und Überleben bis zum Versuchsendpunkt, n = 5 bis 10 je Gruppe.

3.1.6 Renale Leukozyteninfiltration

Neben der Schädigung des renalen Gewebes durch Zelluntergang stellt die renale Entzündungsreaktion einen Mechanismus dar, der zum diabetischen Nierenschaden beiträgt. Um zu untersuchen, ob im Vergleich zum Wildtyp die diabetischen Nieren der Ripk1kd-, Ripk3kd- oder Mlkl-/-Versuchstiere auch unabhängig vom Ausmaß des Zelltods eine veränderte Entzündungsaktivität aufweisen, wurde zunächst das Ausmaß der renalen Leukozyteninfiltration in den diabetischen Tieren aller Versuchsgruppen analysiert. Aus dem zum Versuchsendpunkt entnommenen Nierengewebe wurden daher durchflusszytometrisch unterschiedliche Leukozytenpopulationen quantifiziert.

In der Gesamtzahl renaler CD45+ Leukozyten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wildtyp (4,3% aller Nierenzellen) und den transgenen Mäusen (Ripk1kd: 6,2%; Ripk3kd: 4,5%; Mlkl-/-: 4,5%) (Abbildung 28A).

Auch bei Untersuchung der CD3+ T-Lymphozyten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ihrer renalen Infiltration zwischen Wildtyp- (1,3%) und Ripk1kd- (1,2%), Ripk3kd- (1,0%) und Mlkl-/- Mäusen (1,0%). Entsprechend zeigten sich auch zwischen den vier Genotypen keine Unterschiede in der Zahl renaler CD4+ und CD8+ T-Zellen (Abbildung 28B).

Die durchflusszytometrische Quantifizierung monozytärer Phagozytenpopulationen in den diabetischen Nieren, welche durch Expression bzw. Fehlen der Oberflächenmarker CD11c und/oder F4/80 charakterisiert wurden, zeigte ebenfalls keine Unterschiede im Ausmaß ihrer renalen Infiltration in den vier Versuchsgruppen. Sowohl F4/80+CD11c- Makrophagen (Abbildung 28C) als auch CD11c+ dendritische Zellpopulationen (Abbildung 28D) wiesen ähnliche renale Zellzahlen in allen Gruppen auf.

Eine weitere Aufteilung der renalen mononukleären Phagozyten in fünf Subpopulationen ist durch ein unterschiedliches Expressionsmuster von CD11b und CD11c möglich (116). Ein jeder dieser Subpopulation weist verschiedene Eigenschaften und Funktionen in der Immunantwort auf. Größtenteils ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der renalen Akkumulation dieser Subpopulationen innerhalb der Versuchsgruppen finden. Lediglich CD11b^{low}CD11c^{high} Phagozyten (in ihrer Funktion ähnlich dendritischer Zellen) sowie CD11b⁻CD11c^{int} (Funktionen ähnlich dendritischer Vorläuferzellen) waren in der Ripk1kd-Gruppe im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe signifikante erhöht (p = 0,0029 und p = 0,0101) (Abbildung 28E).

Die Untersuchung der Ly6G+ neutrophilen Granulozyten und Ly6C+ inflammatorischen Makrophagen ergaben ebenfalls keine signifikant unterschiedliche renale Infiltration zwischen den Versuchsgruppen (Abbildung 28F).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich in der durchflusszytometrischen Analyse kein deutlicher Anhalt für eine veränderte renale Leukozyteninfiltration oder Akkumulation einzelner Subpopulationen in diabetischen Ripk1kd-, Ripk3kd- oder Mlkl-/- Mäusen im Vergleich zum Wild-typ ergab.

Α



В





Abbildung 28: Renale Leukozyteninfiltration im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT), Ripk1kd, Ripk3kd und MlkI-/-

Durchflusszytometrische Quantifizierung der unterschiedlichen Leukozytenpopulationen aus dem zum Versuchsendpunkt entnommenen Nierengewebe. Prozentualer Anteil (A) aller CD45+ Leukozyten bezogen auf die Gesamtnierenzellzahl mit nachfolgender Unterteilung in (B) CD3+ T-Lymphozyten (darunter CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten), (C) F4/80+ Makrophagen, (D) CD11c+ dendritische Zellen. (E) Analyse mononukleärer Phagozytenpopulationen entsprechend ihrer CD11b- und CD11c-Expression zur Segmentierung in 5 Subpopulationen. (F) Ly6G+ neutrophile Granulozyten und Ly6C+ inflammatorische Makrophagen aus der CD45+ Leukozytenpopulation. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± SEM aller Versuchstiere mit einer erfolgreichen Diabetesinduktion und Überleben bis zum Versuchsendpunkt, n = 5 bis 10 je Gruppe.

3.1.7 Kompartimentspezifische Leukozyteninfiltration

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen sollten im nächsten Schritt durch eine histologische Untersuchung bestätigt und durch eine kompartimentspezifische Auswertung der Leukozytenakkumulation in Glomeruli und dem Tubulointerstitium ergänzt werden. Hierzu wurde das am Versuchsendpunkt entnommene Nierengewebe immunhistochemisch gefärbt, um CD3+T-Lymphozyten und Makrophagen in den unterschiedlichen Kompartimenten zu quantifizieren.

Interessanterweise ergab sich in der kompartimentspezifischen Auswertung eine signifikant reduzierte Infiltration glomerulärer T-Lymphozyten bei den Mlkl-/- Versuchstieren mit 0,17 CD3+ Zellen/Glomerulus im Vergleich zum Wildtyp mit 0,48 CD3+ Zellen/Glomerulus (p = 0,028). Die Zahl glomerulärer CD3+ T-Zellen in Ripk1kd- und Ripk3kd-Mäusen war dagegen mit den WildtypVersuchstieren vergleichbar. Im Gegensatz hierzu zeigten sich übereinstimmend mit der vorangegangenen durchflusszytometrischen Analyse keine signifikanten Unterschiede bei der Zahl tubulointerstitieller CD3+ T-Lymphozyten zwischen den vier Versuchsgruppen (Abbildung 29A).

Zur kompartimentspezifischen Analyse der renalen Makrophageninfiltration erfolgte zunächst die Quantifizierung der ERHR3+ Makrophagen-Subpopulation in Glomeruli und dem Tubulointerstitium. Hier zeigte sich eine signifikant reduzierte Akkumulation ERHR3+ Zellen in den Glomeruli der diabetischen Mlkl-/- (0,09 ERHR3+ Makrophagen/Glomerulus) und zusätzlich der Ripk3kd-Mäuse (0,20 ERHR3+ Zellen/Glomerulus) im Vergleich zum Wildtyp (0,72 ERHR3+ Zellen/Glomerulus; p = 0,018 bzw. p = 0,049) mit ähnlicher nicht signifikanter Reduktion auch in Ripk1kd-Tieren. Auch im Tubulointerstitium zeigte sich eine signifikante Reduktion ERHR3+ Makrophagen in Ripk3kd-Versuchstieren (9,80 Zellen/Gesichtsfeld) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (27,17 Zellen/Gesichtsfeld; p = 0,038), bei ähnlicher nicht signifikanter Tendenz auch für Ripk1kd- und Mlkl-/- Mäuse (Abbildung 29B).

Ergänzend wurde die tubulointerstitielle Makrophageninfiltration noch durch Quantifizierung von F4/80+ Makrophagen untersucht. Im Tubulointerstitium ergab sich hier zwischen den vier Versuchsgruppen wieder in Übereinstimmung mit der vorangegangenen Durchflusszytometrie kein signifikanter Unterschied (Abbildung 29C). Histologisch färbt der F4/80-Antikörper im Paraffinfixierten Schnitt keine glomerulären Makrophagen an, so dass eine entsprechende Quantifizierung nicht möglich ist.

Zusammengefasst weisen die immunhistologischen Auswertungen auf eine reduzierte glomeruläre Akkumulation von T-Lymphozyten und Makrophagen insbesondere in diabetischen Mlkl-/-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp hin, zum Teil auch (die Makrophageninfiltration betreffend) in Ripk3kd-Tieren. Die Ergebnisse in den Mlkl-/- Versuchstieren korrelieren hierbei mit dem histologisch geringerem glomerulären Schaden und der verminderten Hypoalbuminämie und verringerter Hypercholesterinämie der Mlkl-defizienten Mäuse. Dagegen ergab auch die histologische Analyse mit Ausnahme einer reduzierten Akkumulation ERHR3+ Makrophagen in Ripk3kd-Versuchstieren keine unterschiedliche tubulointerstitielle Leukozyteninfiltration in den vier Genotypen. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie überein, die keine kompartimentspezifische Analyse erlaubt und aufgrund der in den Nieren überwiegend tubulointerstitiell lokalisierten Leukozyten im Wesentlichen diese quantifiziert.











Abbildung 29: Kompartimentspezifische Leukozyteninfiltration im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT), Ripk1kd, Ripk3kd und Mlkl-/-

Immunhistologische Analyse des zum Versuchsendpunkt in Woche 25 entnommenen Nierengewebes. Quantifizierung der glomerulären und tubulointerstitiellen Infiltrationen mit **(A)** CD3+ T-Lymphozyten, **(B)** ERHR3+ Makrophagen und **(C)** F4/80+ Makrophagen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM aller Versuchstiere mit einer erfolgreichen Diabetesinduktion und Überleben bis zum Versuchsendpunkt, n = 5 bis 10 je Gruppe.

3.1.8 Renale Entzündungsmediatoren

Eine veränderte Leukozytenakkumulation in diabetischen Nieren kann auf eine unterschiedlich ausgeprägte renale Entzündungsreaktion hinweisen. Daher wurde im Folgenden die renale mRNA-Expression verschiedener Entzündungsmediatoren untersucht. Die Rolle der analysierten Chemokine besteht in einer Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten in geschädigtes Gewebe. Zudem wurde die Exprimierung weiterer Zytokine, welche bedeutend für die Proliferation und Differenzierung dieser Zellen sind, überprüft. Die Analyse der mRNA-Expression erfolgte anhand des am Versuchsendpunkt entnommenen Nierengewebes nach Isolierung der mRNA, Umschreibung in cDNA und anschließender Quantifizierung anhand der qPCR.

Die renale mRNA-Expression der proinflammatorischen Chemokine zeigten größtenteils keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Versuchsgruppen. Ccl2 als Signalprotein für Monozyten, dendritische Zellen und T-Gedächtniszellen, Ccl5 mit seiner chemotaktischen Wirkung auf T-Lymphozyten, NK-Zellen sowie eosinophile und basophile Granulozyten, wie auch Cxcl9, welches T-Lymphozyten aktiviert, wurden in allen Versuchsgruppen in gleichem Maße renal exprimiert. Das dem Cxcl9 ähnliche Cxcl10 wies eine tendenzielle, aber nicht signifikante Reduktion der mRNA-Expression in den transgenen Gruppen im Vergleich zum Wildtyp auf. Bei dem Chemokin Cxcl5, das vor allem neutrophile Granulozyten aktiviert, ließ sich ebenfalls eine tendenziell verminderte renale Expression in den transgenen Gruppen erkennen, wobei seine mRNA-Expression in Ripk3kd-Versuchstieren signifikant reduziert war (p = 0,014) (Abbildung 30A).

Die Quantifizierung der renalen mRNA-Expression verschiedener proinflammatorischer und regulativer Zytokine ergab ähnliche Ergebnisse (Abbildung 30B). Die Expression von Interferon- γ (Ifn- γ), Interleukin-1 β (II-1 β), Interleukin-6 (II-6) und induzierbarer Stickstoffmonoxidsynthetase (iNos) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die mRNA-Expression von Tnf- α war jedoch in den transgenen Gruppen Ripk1kd und Ripk3kd tendenziell und Mlkl-/signifikant im Vergleich zum Wildtyp reduziert (p = 0,026). Auch bei der mRNA-Expression von Interferon- α (Ifn- α) konnten signifikante Unterschiede ermittelt werden. Die mRNA-Expression in Ripk1kd- und Ripk3kd-Mäusen waren signifikant reduziert im Vergleich zum Wildtyp (p = 0,041 und p = 0,002). In der MLKL-/- Gruppe zeigte sich nur eine tendenzielle Abnahme. Interleukin 10 (II-10) zeigte im Vergleich zum Wildtyp in jeder transgenen Gruppe eine signifikant reduzierte Expression (Ripk1kd: p = 0,005; Ripk3kd: p = 0,002; Mlkl-/-: p = 0,025).

Zusammenfassend zeigen diese mRNA-Expressionsdaten, dass diabetische Mlkl-/- Mäuse im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant verminderte renale Expression von Tnf- α und II-10 aufwiesen, mit tendenziell ebenfalls reduziert exprimierten Chemokinen Cxcl5 und Cxcl10. In den Nieren der Ripk3kd-Mäuse wurde Cxcl5, Ifn- α und II-10 signifikant vermindert exprimiert, bei tendenziell ebenfalls reduzierter Expression von Tnf- α und Cxcl10. Auch Ripk1kd-Mäuse zeigten eine signifikant verminderte renale Ifn- α - und II-10-Expression, bei zusätzlich tendenziell reduzierter Tnf- α -, Cxcl5- und Cxcl10-mRNA. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass bei Fehlen der Kinaseaktivität von Ripk1 und Ripk3, insbesondere aber bei Mlkl-Defizienz trotz des unbeeinflussten renalen Zelltods die renale Entzündungsaktivität im Verlauf der diabetischen Nierenschädigung reduziert ist. In Mlkl-/- Mäusen korreliert dies mit einer verminderten glomerulären Infiltration von T-Lymphozyten und Makrophagen, in Ripk3kd-Versuchstieren mit der reduzierten Zahl der renalen ERHR3+ Makrophagen-Population.





Abbildung 30: mRNA-Expression renaler Entzündungsmediatoren im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT), Ripk1kd, Ripk3kd und Mlkl-/-

Expression renaler Entzündungsmediatoren in dem zum Versuchsendpunkt in Woche 25 entnommenen Nierengewebe. Dargestellt ist die auf 18S rRNA bezogene relative mRNA-Expression in Relation zum WT von (A) den Chemokinen Ccl2, Ccl5, Cxcl5, Cxcl9, Cxcl10, sowie (B) den Zytokinen Tumornekrosefaktor- α

(Tnf- α), Interferon- α (Ifn- α), Interferon- γ (Ifn- γ), Interleukin-1 β (II-1 β), Interleukin-6 (II-6), Interleukin-10 (II-10) und induzierbare Stickstoffmonoxidsynthetase (iNos). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± SEM aller Versuchstiere mit einer erfolgreichen Diabetesinduktion und Überleben bis zum Versuchsendpunkt, n = 5 bis 10 je Gruppe.

3.1.9 Renale Zellschädigung und Fibrosierung

Mittels mRNA-Expressionsanalyse wurde zudem das Ausmaß der renalen Zellschädigung und Fibrosierung in den diabetischen Nieren untersucht. Eine insbesondere in Mlkl-/- Mäusen verminderte glomeruläre Leukozyteninfiltration und renale Entzündungsaktivität könnte mit einer geringeren sekundären Schädigung auch des Tubulointerstitiums einhergehen, die prognostisch mit der nachfolgenden Entwicklung einer chronischen Nierenfunktionseinschränkung korreliert. Das Kidney Injury Molecule-1 (Kim-1) und das Neutrophilengelatinase-assoziierte Lipocalin (NGAL) sind Biomarker, deren vermehrte Expression eine tubuläre Zellschädigung anzeigt. Die Analyse der renalen mRNA-Expression dieser zwei Moleküle zeigte jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass das Ausmaß der tubulären Zellschädigung in den transgenen Gruppen nicht beeinflusst wurde (Abbildung 31A).

Inwieweit eine verminderte entzündliche Aktivität das Ausmaß der renalen Fibrose in den diabetischen Tieren beeinflusst, wurde durch mRNA-Expressionsanalyse der extrazellulären Matrixmoleküle Prokollagen 1, Prokollagen 4, Fibronectin, Laminin, der Fibrosemediatoren Connective Tissue Growth Factor (Ctgf), Transforming Growth Factor β (Tgf- β) sowie der Fibroblastenmarker α -Smooth Muscle Actin (α -Sma) und Ferroptosis Suppressor Protein 1 (Fsp-1) analysiert. Im Wesentlichen zeigte sich ein vergleichbares Expressionsniveau dieser Fibrosemarker in den vier Versuchsgruppen. Es fiel lediglich eine tendenziell reduzierte Expression des extrazellulären Matrixmoleküls Laminin in Ripk1kd- und Ripk3kd-Mäusen auf, die in der Mlkl-/- Versuchsgruppe tatsächlich signifikant vermindert war (p = 0,044) (Abbildung 31B). Aufgrund der insgesamt wenig veränderten renalen Fibroseaktivität in den vier untersuchten Versuchsgruppen wurde auf eine ergänzende histologische Untersuchung der Fibrose verzichtet.

Zusammenfassend weisen diese Daten bei vergleichbarer tubulärer Zellschädigung auch auf ein ähnliches Ausmaß der renalen Fibrose in den diabetischen Wildtyp- und transgenen Tieren hin. Die signifikant verminderte Lamininexpression in den diabetischen Mlkl-/- Nieren könnte jedoch auf einen etwas geringeren fibrotischen Gewebeumbau in den geschädigten Nieren dieses Genotyps hinweisen, was wiederum mit der geringeren glomerulären Leukozyteninfiltration und renalen Entzündungsaktivität bei Mlkl-Defizienz korreliert.

0,0

Riph¹^{ko} oloh^{3ko}

MININ

ý

Α Kim-1 Ngal 10-6-mRNA zu 18S-rRNA (relative Expression) mRNA zu 18S-rRNA (relative Expression) 8 4 6. 4 2 2 0 0 Ripkikd Ripk^{3kd} MIKI N. RIPHIN N. Ript3k MIKI В Prokollagen 1 Prokollagen 4 2,0-3. 8. mRNA zu 18S-rRNA (relative Expression) mRNA zu 18S-rRNA (relative Expression) mRNA zu 18S-rRNA (relative Expression) 1,5 6 2 1,0 4 Ŧ 0,5 2 0,0 0 0 Ripkikd Pipt Kd Ripkakd Riptatd M. Ŵ MIKIT MINIT 'n, Laminin Ctgf 2,5-2,0-2,0 mRNA zu 18S-rRNA (relative Expression) mRNA zu 18S-rRNA (relative Expression) mRNA zu 18S-rRNA (relative Expression) 2,0 1,5 1,5 1,5 1,0 1,0 1,0 0,5 0,5 0,5 0,0[.] 0,0 0,0 **Ripkikd** Ripkakd **P**ipk^{1kd} Ripk3kd MIKIT MININ Ń N. Fsp-1 α-Sma 2,5-6 mRNA zu 18S-rRNA (relative Expression) mRNA zu 18S-rRNA (relative Expression) 2,0-4 1,5-1,0 2 0,5-

.

Pipk3kd

MININ

 92

Fibronectin

RIPK NO DIDK3KO

MIKIT

Tgf-ß

Riph¹^{k0} rink³^{kd}

N.

MIKIT

Untersuchung der renalen Zellschädigung und Fibrosierung durch renale mRNA-Expressionsanalyse an dem zum Versuchsendpunkt in Woche 25 entnommenen Nierengewebe. Dargestellt ist die auf 18S rRNA bezogene relative mRNA-Expression in Relation zum WT von **(A)** Kidney Injury Molecule-1 (Kim-1) und Neutrophilengelatinase-assoziiertem Lipocalin (Ngal) als Marker der proximal tubulären bzw. distal tubulären Zellschädigung und **(B)** den Fibrosemarker Prokollagen 1, Prokollagen 4, Fibronectin, Laminin, Connective Tissue Growth Factor (Ctgf), Transforming Growth Factor β (Tgf- β), α -Smooth Muscle Actin (α -Sma) und Ferroptosis Suppressor Protein 1 (Fsp-1). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± SEM aller Versuchstiere mit einer erfolgreichen Diabetesinduktion und Überleben bis zum Versuchsendpunkt, n = 5 bis 10 je Gruppe.

3.1.10 Zusammenfassung des Phänotyps von Ripk1kd-, Ripk3kd- und MIkI-/- Mäusen im Modell der diabetischen Nephropathie

Der Vergleich der Ripk1kd-, Ripk3kd- und Mlkl-/- Versuchstiere mit Wildtyp-Mäusen im Modell der diabetischen Nephropathie ergab wenige signifikante Unterschiede, allerdings doch Hinweise auf einen möglichen nephroprotektiven Effekt einer Mlkl-Defizienz.

Zunächst zeigte sich, dass die Induktion einer hyperglykämen Stoffwechsellage durch STZ-Injektion im Vergleich zum Wildtyp in weniger Ripk1kd-, Ripk3kd- und insbesondere Mlkl-/- Versuchstieren erfolgreich war. Dies weist auf eine mögliche Rolle der Nekroptose bei Vermittlung der STZ-induzierten Schädigung in den β-Zellen des Pankreas mit nachfolgender Entwicklung eines Insulinmangels hin. Mechanismen dieser STZ-Resistenz in den drei transgenen Mauslinien wurden in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht detaillierter untersucht.

Hinsichtlich der funktionellen Nierenparameter (gemessene GFR vor Versuchsende, Plasmaharnstoffkonzentration, Albuminurie) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und den transgenen Versuchsgruppen am Ende des Beobachtungszeitraums. Allerdings weist die verminderte Hypoalbuminämie und Hypercholesterinämie in diabetischen Mlkl-/- Versuchstieren auf einen geringeren Schaden der glomerulären Filtrationsbarriere hin. Tatsächlich korrelieren bei proteinurischen Nierenerkrankungen in der Maus erhöhte Blutcholesterinwerte sensitiv mit dem Ausmaß der renalen Makrophageninfiltration und Schädigung (117). Als weiteren Hinweis auf eine verminderte glomeruläre Schädigung und Hyperfiltration wiesen diabetische Mlkl-/- Mäuse signifikant kleinere Glomeruli als Wildtyp-Tiere auf. Interessanterweise ergaben sich keine Unterschiede im Ausmaß des renalen Zelltods zwischen Wildtyp-Versuchstieren und den drei transgenen Mauslinien. Dagegen korrelierte der reduzierte glomeruläre Schaden mit einer signifikant verminderten glomerulären, nicht jedoch tubulointerstitiellen Infiltration von T-Lymphozyten und Makrophagen in den diabetischen Mlkl-/- Mäusen am Versuchsende. Dies ging mit einer reduzierten renalen Expression einzelner Entzündungsmediatoren wie Tnf-α und II-10 und dem extrazellulären Matrixprotein Laminin in diabetischen Mlkl-/- Mäusen einher.

Einzelne untersuchte Parameter wie tubulointerstitielle Makrophageninfiltration oder die renale Expression einzelner Entzündungsmediatoren waren auch in diabetischen Ripk1kd- oder Ripk3kd-Versuchstieren im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert, dies korrelierte jedoch nicht mit verminderten glomerulären Schadensmarkern.

Insgesamt weisen damit die hier erarbeiteten Daten auf den möglichen nephroprotektiven Effekt einer Mlkl-Defizienz im Verlauf der diabetischen Nierenschädigung hin. Interessanterweise scheint hier die pathophysiologische Rolle von Mlkl nicht auf Vermittlung von Nekroptose oder anderen Zelltodformen, sondern auf proinflammatorischen Effekten zu beruhen, die zur glomerulären Leukozyteninfiltration und renalen Entzündung führen.

3.2 Die A20-defiziente Maus im Modell der diabetischen Nephropathie

Die zweite Hypothese, die in dieser Arbeit untersucht werden sollte, waren mögliche antiinflammatorische und antinekroptotische Funktionen des endogen als negativer Regulator exprimierten Proteins A20. Fehlen dieses physiologischen Inhibitors sollte daher zu einer verstärkten Inflammation und einem gesteigerten renalen Zelltod im Verlauf der diabetischen Nephropathie führen und den entstehenden Nierenschaden entsprechend verschlechtern. Für die folgenden Untersuchungen wurde daher in Wildtyp- und A20+/- Mäusen ein Diabetes mellitus durch STZ-Injektionen induziert (siehe Kapitel 2.2.7). Zuvor erfolgte zur Steigerung des Nierenschadens die unilaterale Nephrektomie (siehe Kapitel 2.2.6). Als Kontrollgruppen dienten jeweils naive Versuchstiere des gleichen Alters und Genotyps, bei denen keinerlei Interventionen durchgeführt wurden und die einen normalen Glukosestoffwechsel aufwiesen.

3.2.1 Der Erfolg der Diabetesinduktion

Die wöchentlich bestimmten Blutzuckerwerte zeigten bei ähnlichem Verlauf einen deutlichen Anstieg der Glukosewerte in den Wildtyp- und A20+/- Versuchsmäusen innerhalb der ersten Wochen nach Diabetesinduktion, welche nach zwei bis vier Wochen bei Werten um 500 mg/dl lagen (Abbildung 32A). Zum Versuchsendpunkt lagen die mit dem Blutzuckermessgerät bestimmten Durchschnittswerte in beiden Versuchsgruppen bei >530 mg/dl (Abbildung 32B).



Abbildung 32: Blutglukose gemessen mit dem Blutzuckermessgerät ACCU-Chek Aviva im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT) und A20+/-

(A) bei wöchentlicher Bestimmung im Verlauf von 27 Wochen, (B) zum Versuchsendpunkt in der Woche 27. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM aller Versuchstiere mit Überleben bis zum Versuchsendpunkt, n = 11 und 12 je Gruppe.

Zusätzlich erfolgten die Bestimmung der Plasmaglukose und HbA1c-Werte durch Blutentnahme und Plasmaanalyse am Versuchsende in Woche 27. Hier ergaben sich in den STZ-injizierten Wildtyp- und A20+/- Versuchstieren Glukosewerte von 826 mg/dl bzw. 688 mg/dl, die HbA1c-Werte lagen bei 9,8% bzw. 8,4%. Unbehandelte Kontrolltiere beider Genotypen wiesen jeweils signifikant geringere Plasmaglukose- und HbA1c-Werte auf (jeweils p < 0,0001) (Abbildung 33).



Abbildung 33: Plasmaglukose und HbA1c-Wert zum Versuchsendpunkt (Woche 27) im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT) und A20+/-, sowie den jeweiligen unbehandelten Kontrollgruppen

Im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren (Co) des gleichen Genotyps wiesen STZ-injizierte Wildtyp-(WT) und A20+/- Mäuse zum Versuchsendpunkt eine deutliche Hyperglykämie mit 826 mg/dl und 688 mg/dl und einen HbA1c-Wert von 9,8% bzw. von 8,4% auf. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM aller Versuchstiere mit Überleben bis zum Versuchsendpunkt (DN), sowie die jeweiligen gleichaltrigen Kontrollgruppen, n = 4 bis 12 je Gruppe.

Für die nachfolgende Auswertung der diabetischen Nierenschädigung wurden in der Interventionsgruppe nur Wildtyp- und A20+/- Versuchstiere mit einem HbA1c-Wert > 5,0% am Versuchsende eingeschlossen. Wie in Abbildung 34 dargestellt, entwickelte sich in diesen erfolgreich Diabetes-induzierten Tieren die Hyperglykämie in beiden Genotypen vergleichbar. Ebenso waren Blutzuckerwerte sowie Plasmaglukose- und HbA1c-Werte in diabetischen Wildtyp- und A20+/-Versuchstieren vergleichbar und letztere jeweils hochsignifikant höher als in den unbehandelten Kontrolltieren des gleichen Genotyps (jeweils p < 0,0001) (Abbildung 35).





(A) bei wöchentlicher Bestimmung im Verlauf von 27 Wochen, (B) zum Versuchsendpunkt in der Woche 27. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM aller Versuchstiere mit einer erfolgreichen Diabetesinduktion und Überleben bis zum Versuchsendpunkt, n = 10 und 11 je Gruppe.



Abbildung 35: Plasmaglukose und HbA1c-Wert zum Versuchsendpunkt (Woche 27) im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT) und A20+/-, sowie den jeweiligen naiven Kontrollgruppen Alle in die weiteren Auswertungen aufgenommenen Versuchstiere wiesen zum Versuchsendpunkt eine deutliche Hyperglykämie > 500 mg/dl und einen HbA1c > 5,0% auf. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren (Co) des gleichen Genotyps wiesen STZ-injizierte Wildtyp- (WT) und A20+/- Mäuse zum Versuchsendpunkt eine deutliche Hyperglykämie mit 826 mg/dl und 788 mg/dl und einen HbA1c-Wert von 9,8% bzw. 9,4% auf. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± SEM aller Versuchstiere mit einer erfolgreichen Diabetesinduktion und Überleben bis zum Versuchsendpunkt (DN), sowie die jeweiligen gleichaltrigen Kontrollgruppen, n = 4 bis 11 je Gruppe.

Der Erfolg der Diabetesinduktion nach fünfmaliger STZ-Injektion lag im Wildtyp bei 100%, bei den A20+/- Mäusen bei 83,3% (Abbildung 36). Es wurde keine doppelte STZ-Injektion durchgeführt.



Abbildung 36: Prozentuale Erfolgsrate der Diabetesinduktion nach fünf Streptozotocin-Injektionen im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT) und A20+/-

Während die Diabetesinduktion bei dem Wildtyp zu 100% erfolgreich verlief, konnten bis zum Versuchsendpunkt nur 83% der A20+/- Versuchstiere nach den ersten fünf STZ-Gaben eine diabetische Stoffwechsellage aufweisen. Die Daten repräsentieren die Werte aller bis zum Versuchsendpunkt überlebenden Versuchstiere, n = 11 und 12 je Gruppe.

3.2.2 Mortalität und Gewichtsverlauf

Über den Versuchszeitraum von 27 Wochen nach Diabetesinduktion mussten einige moribunde Versuchstiere ab Woche 12 euthanasiert werden. Die Sterblichkeit betrug bei den diabetischen Wildtyp-Tieren 31,3%, bei den A20+/- Mäusen 9,1%. Dieser Mortalitätsunterschied zwischen den beiden Gruppen war jedoch nicht signifikant (Abbildung 37).



Abbildung 37: Mortalität im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT) und A20+/-Überlebenskurven mit Beginn bei der ersten Streptozotocin-Gabe an Tag 0 bis zur Woche 27. Beim Wildtyp mussten von initial 16 Mäusen fünf Versuchstiere in Woche 12 (2x), 14, 18, 22 euthanasiert werden, während in der A20+/- Gruppe (initial n = 11) ein Tier in der Woche 24 ausschied. Die Daten repräsentieren die Werte aller Versuchstiere mit erfolgreicher Diabetesinduktion, n = 11 und 16 je Gruppe.

Das Körpergewicht betreffend konnte ein vergleichbarer Verlauf in beiden diabetischen Versuchsgruppen mit einer leichten Gewichtszunahme über die Zeit gesehen werden (Abbildung 38A). Auch das Körpergewicht zum Versuchsendpunkt (Abbildung 38B) zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen diabetischen Wildtyp- und A20+/- Versuchstieren.

Bei vergleichbarer hyperglykämer Stoffwechsellage zeigten somit diabetische Wildtyp- und A20+/- Mäuse bis zum Versuchsende in Woche 27 eine vergleichbare Entwicklung. Folglich wurde davon ausgegangen, dass beide Gruppen über die Experimentdauer einen ähnlichen gesundheitlichen Status aufwiesen.



Abbildung 38: Körpergewicht im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT) und A20+/-(A) bei wöchentlicher Bestimmung im Verlauf von 27 Wochen, (B) zum Versuchsendpunkt in Woche 27. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM aller Versuchstiere mit einer erfolgreichen Diabetesinduktion und Überleben bis zum Versuchsendpunkt, n = 10 und 11 je Gruppe.

3.2.3 Funktionelle Nierenparameter

Glomeruläre Filtrationsrate

Um die renale Funktion zu überprüfen, wurde in Woche 25 nach Diabetesinduktion die glomeruläre Filtrationsrate zur Abschätzung der Nierenfunktion transkutan in diabetischen Wildtyp- und A20+/- Mäusen sowie unbehandelten Kontrolltieren beider Genotypen gemessen. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Wildtyp: 288,8 µl/min; A20+/-: 263,0 µl/min) war bei den diabetischen Versuchstieren eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Abnahme der GFR zu verzeichnen, was auf eine beginnende renale Funktionseinschränkung in den diabetischen Mäusen hinweist. Im Vergleich der diabetischen Wildtyp- (202,1 µl/min) und A20+/- Versuchstiere (194,0 µl/min) konnte kein Unterschied in der GFR ermittelt werden (Abbildung 39A).

Albuminurie

Des Weiteren erfolgte ein ELISA aus dem zum Versuchsendpunkt entnommenen Spontanurin zur Bestimmung der Albuminurie, die in Form des Albumin/Kreatinin-Quotienten verglichen wurde. In den diabetischen Mäusen lässt sich eine tendenzielle, nicht signifikante Zunahme der Albuminurie in den beiden diabetischen Versuchsgruppen (Wildtyp: 129,9 µg/mg Kreatinin; A20+/-: 147,4 µg/mg Kreatinin) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollgruppen (Co Wildtyp: 17,94 µg/mg Kreatinin; Co A20+/-: 48,41 µg/mg Kreatinin) erkennen. Bei Vergleich der Wildtyp- und A20+/- Gruppen zeigte sich kein Unterschied in der Höhe der Albuminurie (Abbildung 39B).

Blutanalyse

Als wichtiges Retentionsparameter wurde der Harnstoff im Plasma aus der am Versuchsendpunkt entnommenen Blutprobe analysiert. Es zeigte sich eine signifikante Steigerung (jeweils p < 0,001) der Harnstoffwerte in den diabetischen Versuchsgruppen (Wildtyp: 120,5 mg/dl; A20+/-: 106,6 mg/dl) im Vergleich zur Kontrollgruppe des gleichen Genotyps (Co Wildtyp: 60,50 mg/dl; Co A20+/-: 67,83 mg/dl). Allerdings waren die Harnstoffwerte in den diabetischen Wildtyp- und A20+/- Versuchsmäusen vergleichbar (Abbildung 39C).

Zudem wurden die Blutproben auf Parameter eines sich entwickelnden nephrotischen Syndroms untersucht, welches durch eine gestörte Blut-Harn-Schranke als Folge des chronischen Diabetes entstehen kann. Es ließ sich zeigen, dass in den diabetischen Wildtyp- und A20+/- Mäusen im Vergleich zu ihren unbehandelten Kontrolltieren eine signifikante Hypoalbuminämie (jeweils p < 0,0001) und eine Hypoproteinämie (A20+/-: p = 0,004) vorhanden war. Die Ausprägung war in den diabetischen Wildtyp- und A20+/- Versuchstieren jedoch vergleichbar (Abbildung 39D).

Bei Bestimmung der Plasmalipide zeigte sich in diabetischen Wildtyp-Tieren eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Zunahme des Plasmacholesterins im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe, dagegen signifikant reduzierte Cholesterinwerte der diabetischen A20+/- Tiere gegenüber unbehandelten Kontrolltieren (p = 0,008) und den diabetischen Wildtyp-Tieren (p < 0,0001). Die Triglyceridwerte stiegen in den diabetischen Gruppen im Gegensatz zur jeweiligen Kontrollgruppe tendenziell an, ohne signifikante Unterschiede zwischen den diabetischen Wildtyp- und A20+/- Mäusen (Abbildung 39E).

Zusammengefasst weist die Auswertung der funktionellen Parameter am Versuchsendpunkt mit tendenziell erniedrigter GFR, signifikant erhöhten Plasmaharnstoffwerten, nicht signifikant verstärkter Albuminurie sowie Hypoalbuminämie und Gesamteiweiserniedrigung auf die Entwicklung einer diabetischen Nierenschädigung in den diabetischen Wildtyp- und A20+/- Mäusen hin. Mit

Ausnahme einer fehlenden Hypercholesterinämie bei A20-Defizienz sind diese funktionellen Parameter jedoch in diabetischen Wildtyp- und A20+/- Mäusen vergleichbar, was auf einen ähnlich ausgeprägten Nierenschaden in den beiden Genotypen hinweist.



Abbildung 39: Funktionelle Nierenparameter zum Versuchsendpunkt im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT) und A20+/-, sowie den jeweiligen unbehandelten Kontrollgruppen
(A) Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) nach transkutaner Bestimmung durch die renale FITC-Sinistrin Elimination in Woche 25, (B) Albuminurie im Spontanurin am Versuchsendpunkt, ausgedrückt als Albumin/Kreatinin-Quotient, (C) Plasmaharnstoff als Retentionsparameter, (D) Plasmaalbumin und Gesamtprotein,
(E) Plasmacholesterin und Triglyceride am Versuchsendpunkt. Die Entnahme der Plasmaproben erfolgte zum Versuchsendpunkt in Woche 27. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± SEM aller Versuchstiere

mit einer erfolgreichen Diabetesinduktion und Überleben bis zum Versuchsendpunkt (DN), sowie die jeweiligen gleichaltrigen Kontrollgruppen (Co), n = 4 bis 11 je Gruppe.

3.2.4 Struktureller Schaden

Um strukturelle Parameter des Nierenschadens in den diabetischen Versuchstieren zu erfassen, wurden histologische Schnitte aus dem zum Versuchsendpunkt entnommenen Nierengewebe PAS-gefärbt und ausgewertet. Die glomeruläre Größe wurde als Relation von Pixelzahl der markierten Glomerulusfläche zur Pixelzahl des Gesamtbilds bestimmt. Des Weiteren wurde die mesangiale Matrixexpansion durch den Quotienten aus Matrixfläche zur glomerulären Fläche ermittelt.

Die morphometrische Analyse zeigt, dass es in den beiden diabetischen Versuchsgruppen zu einer Zunahme der glomerulären Größe gekommen war. Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollgruppen ergab sich beim Wildtyp eine signifikante Zunahme der Glomerulusgröße (Co Wildtyp: 0,154; diabetischer Wildtyp: 0,194; p = 0,0407), während dies bei den diabetischen A20+/- Versuchstieren tendenziell, aber nicht signifikant (Co A20+/-: 0,162; diabetische A20+/-: 0,183) der Fall war. Zwischen den beiden diabetischen Versuchsgruppen lagen allerdings keine Unterschiede der mittleren glomerulären Querschnittsfläche vor (Abbildung 40A).

Der Vergleich der mesangialen Matrixexpansion ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen unbehandelten Kontrollgruppen und diabetischen Versuchsgruppen, ebenso kein Unterschied zwischen den diabetischen Versuchstieren (diabetischer Wildtyp: 0,095; diabetische A20+/-: 0,085) (Abbildung 40B).

Zusammenfassend zeigt die histologische Auswertung mit Nachweis einer glomerulären Größenzunahme beginnende strukturelle Veränderungen der diabetischen Nephropathie. Es zeigt sich jedoch kein Unterschied im Vergleich der diabetischen Wildtyp- und A20+/- Versuchstiere. Beide Genotypen weisen damit bei vergleichbaren funktionellen Parametern der diabetischen Nierenschädigung auch einen ähnlichen strukturellen Nierenschaden auf.



Abbildung 40: Histologische Evaluation des renalen strukturellen Schadens im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT) und A20+/-, sowie den jeweiligen unbehandelten Kontrollgruppen pen

Der Vergleich des strukturellen Schadens erfolgte anhand PAS-gefärbter histologischer Schnitte aus dem zum Versuchsendpunkt entnommenen Nierengewebes. (A) Auswertung der glomerulären Größe durch Erfassung der Pixelzahl der Glomerulusquerschnitte bei 400-facher Vergrößerung in Relation zur Pixelzahl des Gesamtbildes. (B) Mesangiale Matrixexpansion, bestimmt als Anteil der PAS-positiven Glomerulusfläche in Relation zum glomerulären Gesamtquerschnitt. (C) Histologische Aufnahme repräsentativer Glomeruli. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM aller Versuchstiere mit einer erfolgreichen Diabetesinduktion und Überleben bis zum Versuchsendpunkt (DN), sowie die jeweiligen gleichaltrigen Kontrollgruppen (Co), n = 4 bis 11 je Gruppe.

3.2.5 Renaler Zelltod

Für den Nachweis einer bei A20-Defizienz möglicherweise verstärkten renalen Nekroptose im Verlauf der diabetischen Nephropathie wurde das Ausmaß des renalen Zelluntergangs untersucht. Hierzu wurde das zum Versuchsendpunkt entnommene Nierengewebe in histologische Schnitte aufgearbeitet und mit der TUNEL-Färbung gefärbt. Es erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Quantifizierung der angefärbten absterbenden Zellen im Glomerulus und Tubulointerstitium.

Die Auswertung ergab in den unbehandelten Kontrolltieren eine tendenzielle, aber nicht signifikante Zunahme nekrotischer Zellen in den Glomeruli der A20+/- Mäuse im Vergleich zum Wildtyp (Co Wildtyp: 0,03 Zellen/Glomerulus, Co A20+/-: 0,16 Zellen/Glomerulus). Bei den Diabetesmäusen fanden sich im Vergleich zu den gesunden Tieren tendenziell mehr absterbende Zellen (diabetischer Wildtyp: 0,23 Zellen/Glomerulus, diabetische A20+/-: 0,26 Zellen/Glomerulus), allerdings ergaben sich hier keine signifikanten Unterschiede. Insbesondere die Zahl nekrotischer Zellen in diabetischen Wildtyp- und A20+/- Mäusen war vergleichbar (Abbildung 41A).

Bei Analyse des Tubulointerstitiums ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Zahl nekrotischer Zellen zwischen unbehandelten Wildtyp- und A20+/- Kontrolltieren sowie diabetischen Versuchstieren beider Genotypen. In allen Versuchstiergruppen war der Zelltod in diesem Kompartiment vergleichbar (Abbildung 41B).

Diese Daten weisen darauf hin, dass A20-Defizienz im Verlauf des hier untersuchten diabetischen Nephropathie-Modells nicht zu einem verstärkt auftretenden renalen Zelltod, insbesondere in den diabetisch geschädigten Glomeruli führt.





Die Quantifizierung nekrotischer Zellen erfolgte mittels TUNEL-Färbung histologischer Schnitte aus dem zum Versuchsendpunkt entnommenen Nierengewebes. (A) Glomerulärer Zelltod, (B) Tubulointerstitieller Zelltod, (C) Repräsentative TUNEL-gefärbte Nierenschnitte unter Fluoreszenzlicht, 200-fache Vergrößerung. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM aller Versuchstiere mit einer erfolgreichen Diabetesinduktion und Überleben bis zum Versuchsendpunkt (DN), sowie die jeweiligen gleichaltrigen Kontrollgruppen (Co), n = 4 bis 11 je Gruppe.

3.2.6 Renale Leukozyteninfiltration

Das protektive Protein A20 hat sowohl antinekroptotische wie auch antiinflammatorische Funktionen. Demzufolge ist die Analyse der renalen Entzündungsaktivität im Vergleich zwischen A20-defizienten Versuchstieren zum Wildtyp von großer Bedeutung. Die Einwanderung von Entzündungszellen in das Nierengewebe wurde daher zunächst durchflusszytometrisch im zum Versuchsende entnommenen Nierengewebe untersucht und die unterschiedlichen Leukozytenpopulationen quantifiziert.

Bei der Zahl von CD45+ Leukozyten im renalen Gewebe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den unbehandelten und diabetischen Versuchstieren beider Genotypen, wobei die Wildtyp-Kontrolltiere tendenziell die geringste renale Leukozyteninfiltration aufwiesen (Abbildung 42A).

Die Quantifizierung renaler CD3+ T-Lymphozyten ergab dagegen eine signifikant stärkere Zellzahl in diabetischen Wildtyp-Tieren im Vergleich zu unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (Co Wildtyp: 0,36% Zellen/Gesamtnierenzellen; diabetischer Wildtyp: 1,65% Zellen/Gesamtnierenzellen; p = 0,001). Dies beruhte vor allem auf einem signifikanten Anstieg der CD4+ T-Zellen (p = 0,0257) in den diabetischen Wildtyp-Tieren im Vergleich zur unbehandelten Wildtyp-Kontrollgruppe, bei tendenziellen auch ansteigenden CD8+ T-Zellen in der diabetischen Gruppe (Abbildung 42B).

In ähnlicher Weise fand sich eine signifikant stärkere renale Akkumulation F4/80+ Makrophagen in der diabetischen Wildtyp-Gruppe im Vergleich zu ihren unbehandelten Kontrolltieren (Co Wild-typ: 0,94% Zellen/Gesamtnierenzellen; diabetischer Wildtyp: 2,06% Zellen/Gesamtnierenzellen; p = 0,040) (Abbildung 42C). CD11c+ dendritische Zellen und ihre Subpopulationen (Abbildung 42D) wie auch Ly6G+ Granulozyten und Ly6C+ inflammatorische Makrophagen (Abbildung 42E) zeigten dagegen keine verstärkte Infiltration in die Nieren der diabetischen Wildtyp-Tiere.

Unter den verschiedenen quantifizierten mononukleären Phagozyten-Subpopulationen konnte lediglich in der CD11b^{high}CD11c^{high} Subpopulation (einer Phagozytenpopulation mit hoher Antigenpräsentierender Aktivität) ein signifikanter Anstieg der Zellzahl in diabetischen Wildtyp-Tieren im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen des gleichen Genotyps identifiziert werden (Co Wildtyp: 0,09% Zellen/Gesamtnierenzellen; diabetischer Wildtyp: 0,42% Zellen/Gesamtnierenzellen; p = 0,031) (Abbildung 42F).

Interessanterweise wiesen bereits unbehandelte A20+/- Kontrollmäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen eine tendenziell erhöhte renale Leukozytenzahl auf, was sich mit Ausnahme von CD11c+ F4/80+ dendritischen Zellen, Ly6G+ neutrophilen Granulozyten und Ly6c+ inflammatorischen Makrophagen in allen weiteren Leukozyten-Subpopulationen zeigte. Allerdings war diese verstärkte renale Akkumulation nicht so ausgeprägt, dass die Unterschiede signifikant waren (Abbildung 42A-F). Diabetische A20+/- Versuchstiere wiesen dagegen im Vergleich zu den unbehandelten A20+/- Kontrolltieren keine zusätzlich verstärkte Infiltration CD45+ Leukozyten oder ihrer untersuchten Subpopulationen auf. Die renale Leukozytenzahl war bei unbehandelten und diabetischen A20+/- Mäusen durchweg vergleichbar (Abbildung 42A-F).

Auch im Vergleich von diabetischen Wildtyp- und A20+/- Versuchstieren zeigte die durchflusszytometrische Analyse eine vergleichbare renale Infiltration von CD45+ Leukozyten sowie aller untersuchten Leukozyten-Subpopulationen (Abbildung 42A-F).

Zusammenfassend demonstrieren die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen eine vergleichbare renale Leukozytenakkumulation in den diabetischen Wildtyp- und A20+/- Versuchstieren. Obwohl unbehandelte A20+/- Kontrollmäuse im Vergleich zum Wildtyp bereits eine tendenziell erhöhte renale Leukozytenzahl aufwiesen, führt A20-Defizienz nicht zu einer stärkeren Leukozyteninfiltration in diabetischen Nieren.







DNWI NA20H



D



Abbildung 42: Renale Leukozyteninfiltration im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT) und A20+/-, sowie den jeweiligen unbehandelten Kontrollgruppen

Durchflusszytometrische Quantifizierung der unterschiedlichen Leukozytenpopulationen aus dem zum Versuchsendpunkt entnommenen Nierengewebe. Prozentualer Anteil (A) aller CD45+ Leukozyten bezogen auf die Gesamtnierenzellzahl mit nachfolgender Unterteilung in (B) CD3+ T-Lymphozyten (darunter CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten), (C) F4/80+ Makrophagen, (D) CD11c+ dendritische Zellen, (E) Ly6G+ neutrophile Granulozyten und Ly6C+ inflammatorische Makrophagen. (F) Analyse mononukleärer Phagozytenpopulationen entsprechend ihrer CD11b- und CD11c-Expression zur Segmentierung in 5 Subpopulationen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM aller Versuchstiere mit einer erfolgreichen Diabetesinduktion und Überleben bis zum Versuchsendpunkt (DN), sowie die jeweiligen gleichaltrigen Kontrollgruppen (Co), n = 4 bis 11 je Gruppe.

3.2.7 Kompartimentspezifische Leukozyteninfiltration

Um die ermittelten Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung zu bestätigen und kompartimentspezifisch in Glomeruli und Tubulointerstitium auszuwerten, wurde eine immunhistochemische Analyse durchgeführt. Hierfür wurde das am Versuchsendpunkt entnommene Nierengewebe immunhistochemisch für CD3+ T-Lymphozyten und Makrophagenpopulationen angefärbt und quantifiziert.

Die Analyse der renalen T-Lymphozytenzahl ergab sowohl in den Glomeruli als auch im Tubulointerstitium keine signifikanten Unterschiede der Zellzahl im Vergleich aller unbehandelten und diabetischen Tiergruppen beider Genotypen. Tendenziell war jedoch die glomeruläre und tubulointerstitielle CD3+ Zellzahl in diabetischen Wildtyp-Versuchstieren im Vergleich zu ihrer unbehandelten Kontrolle erhöht. Wie bereits in der vorangegangenen durchflusszytometrischen Analyse zeigte sich auch ein nicht signifikanter Trend zu einer erhöhten T-Lymphozytenzahl in den unbehandelten A20+/- Kontrolltieren gegenüber den Wildtyp-Kontrollen, sowohl glomerulär als auch im Tubulointerstitium. Ebenfalls übereinstimmend mit der Durchflusszytometrie war die glomeruläre als auch tubulointerstitielle T-Lymphozytenzahl in diabetischen Wildtyp- und A20+/- Versuchstieren vergleichbar (Abbildung 43A).

Die histologische Quantifizierung der renalen Makrophagen ergab eine vergleichbare Zahl ERHR3+ Makrophagen in Glomeruli und Tubulointerstitium der unbehandelten Wildtyp- und A20+/- Versuchstiere (Abbildung 43B), sowie eine vergleichbare tubulointerstitielle Akkumulation F4/80+ Makrophagen (Abbildung 43C).

Diabetische Wildtyp- und A20+/- Mäuse zeigten dagegen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren des gleichen Genotyps eine verstärkte glomeruläre und tubulointerstitielle Makrophageninfiltration. Hierbei konnte in den diabetischen A20+/- Mäusen eine signifikant vermehrte Infiltration glomerulärer ERHR3+ Makrophagen (Co A20+/-: 0,13 ERHR3+ Zellen/Glomerulus; diabetische A20+/-: 1,86 ERHR3+ Zellen/Glomerulus; p = 0,004), tubulointerstitieller ERHR3+ Makrophagen (Co A20+/-: 2,17 ERHR3+ Zellen/Gesichtsfeld; diabetische A20+/-: 62,02 ERHR3+ Zellen/Gesichtsfeld; p = 0,0002) sowie tubulointerstitieller F4/80+ Phagozyten (Co A20+/-: 0,005 F4/80+ Zellen/Gesichtsfeld; diabetische A20+/-: 0,011 F4/80+ Zellen/Gesichtsfeld; p = 0,048) im Vergleich zu unbehandelten A20+/- Kontrollen nachgewiesen werden. In den diabetischen Wildtyp-Tieren zeigte sich eine ähnliche, jedoch nicht signifikante Tendenz für eine verstärkte renale Makrophageninfiltration (Abbildung 43B und C).

Im Gegensatz zur durchflusszytometrischen Auswertung konnte histologisch nach ERHR3-Färbung auch eine signifikant vermehrte renale Akkumulation ERHR3+ Makrophagen im Tubulointerstitium der diabetischen A20+/- Versuchstiere im Vergleich zur diabetischen Wildtyp-Gruppe nachgewiesen werden (diabetischer Wildtyp: 26,9 ERHR3+ Zellen/Gesichtsfeld; diabetische A20+/-: 62,02 ERHR3+ Zellen/Gesichtsfeld; p = 0,011). Verglichen mit dem Wildtyp zeigten diabetische A20+/- Mäuse auch eine tendenziell, jedoch nicht signifikant vermehrte Infiltration glomerulärer ERHR3+ und tubulointerstitieller F4/80+ Makrophagen (Abbildung 43B und C).

Zusammengefasst weist diese histologische Auswertung auf eine gesteigerte glomeruläre und tubulointerstitielle Leukozyteninfiltration in diabetischen Nieren hin, die in diabetischen A20+/-Nieren im Vergleich zum Wildtyp insbesondere für die ERHR3+ tubulointerstitielle Makrophagenpopulation signifikant gesteigert ist. Bei fehlendem Einfluss auf das Ausmaß des renalen Zelltods könnte A20-Defizienz somit zu einer Steigerung einzelner Komponenten der renalen Entzündungsantwort bei diabetischer Nierenschädigung führen.






Abbildung 43: Kompartimentspezifische Leukozyteninfiltration im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT) und A20+/-, sowie den jeweiligen unbehandelten Kontrollgruppen
Immunhistologische Analyse des zum Versuchsendpunkt in Woche 27 entnommenen Nierengewebes.
Quantifizierung der glomerulären und tubulointerstitiellen Infiltrationen mit (A) CD3+ T-Lymphozyten,
(B) ERHR3+ Makrophagen und (C) F4/80+ Makrophagen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± SEM aller Versuchstiere mit einer erfolgreichen Diabetesinduktion und Überleben bis zum Versuchsendpunkt (DN), sowie die jeweiligen gleichaltrigen Kontrollgruppen (Co), n = 4 bis 11 je Gruppe.

3.2.8 Renale Entzündungsmediatoren

Zur weiterführenden Untersuchung einer durch A20-Defizienz möglicherweise beeinflussten renalen Entzündungsaktivität im Verlauf der diabetischen Nierenschädigung erfolgte eine mRNA-Expressionsanalyse verschiedener Entzündungsmediatoren nach Isolierung der mRNA aus dem zum Versuchsendpunkt entnommenen Nierengewebe, einer Umschreibung in cDNA und nachfolgender Quantifizierung anhand der qPCR.

Die Analyse der renalen mRNA-Expression proinflammatorischer Chemokine (Abbildung 44A) ergab ein niedriges, nicht signifikant unterschiedliches Expressionsniveau in der Wildtyp- und A20+/- Kontrollgruppe. Die Wildtyp-Versuchstiere mit diabetischer Stoffwechsellage zeigten bei Ccl2, Ccl5 und Cxcl9 keine gesteigerte, bei Cxcl5 eine tendenzielle und bei Cxcl10 eine signifikant (p = 0,008) verstärkte renale mRNA-Expression verglichen mit der Wildtyp-Kontrollgruppe. Die diabetischen A20+/- Versuchstiere zeigten im Vergleich zu ihrer unbehandelten Kontrollgruppe dagegen eine signifikant verstärkte renale mRNA-Expression von Ccl2 (p = 0,0002), Ccl5 (p < 0,0001), Cxcl9 (p < 0,0001) und Cxcl10 (p < 0,0001). Insbesondere wiesen diabetische A20+/- Versuchstiere gegenüber diabetischen Wildtyp-Tieren eine signifikant höhere renale

mRNA-Expression für Ccl2 (p < 0,0001), Ccl5 (p < 0,0001), Cxcl9 (p < 0,0001) und Cxcl10 (p < 0,0001) auf.

Die Analyse der mRNA-Expression renaler Zytokine (Abbildung 44B) erbrachte ähnliche Ergebnisse. In den beiden Kontrollgruppen wurden alle untersuchten Entzündungsmediatoren nur gering und vergleichbar exprimiert. Die Zunahme der mRNA-Expression in der diabetischen Wildtyp-Versuchsgruppe war bei Tnf- α , Ifn- α , Ifn- γ , II-6, II-10 tendenziell und bei der iNos im Vergleich zur unbehandelten Wildtyp-Kontrolle signifikant (p = 0,043) erhöht. Die renale mRNA-Expression in den diabetischen A20+/- Versuchstieren wies im Vergleich zur A20+/- Kontrollgruppe signifikant erhöhte Werte für Tnf- α (p = 0,003), Ifn- γ (p = 0,0006), II-1 β (p = 0,0008), II-6 (p = 0,04), II-10 (p = 0,002) und iNos (p < 0,0001) auf. Im Vergleich zu diabetischen Wildtyp-Versuchstieren zeigten diabetische A20+- Mäuse eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von Ifn- γ (p = 0,01), II-1 β (p = 0,0004) und iNos (p = 0,0006).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass bei erhöhtem renalen Expressionsniveau einzelner inflammatorischer Chemokine und Zytokine die diabetische Nierenschädigung sowohl in den hier untersuchten Wildtyp- als auch A20+/- Mäusen mit einer vermehrten renalen Entzündungsreaktion einhergeht. Hierbei zeigt sich in A20-defizienten diabetischen Tieren eine im Vergleich zum diabetischen Wildtyp erhöhte renale Expression renaler Entzündungsmediatoren, was auf eine verstärkte renale Entzündungsaktivität bei A20-Defizienz im Verlauf der diabetischen Nierenschädigung hinweist und mit der verstärkten Akkumulation tubulointerstitieller Makrophagen in dieser Versuchsgruppe korreliert.



Β



Abbildung 44: mRNA-Expression renaler Entzündungsmediatoren im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT) und A20+/-, sowie den jeweiligen unbehandelten Kontrollgruppen Expression renaler Entzündungsmediatoren in dem zum Versuchsendpunkt in Woche 27 entnommenen Nierengewebe. Dargestellt ist die auf 18S rRNA und Gapdh bezogene relative mRNA-Expression in Relation zum WT von (A) den Chemokinen Ccl2, Ccl5, Cxcl5, Cxcl9, Cxcl10, sowie (B) den Zytokinen Tumornekrosefaktor-α (Tnf-α), Interferon-α (Ifn-α), Interferon-γ (Ifn-γ), Interleukin-1β (II-1β), Interleukin-6 (II-6), Interleukin-10 (II-10) und induzierbare Stickstoffmonoxidsynthetase (iNOS). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± SEM aller Versuchstiere mit einer erfolgreichen Diabetesinduktion und Überleben bis zum Versuchs-

endpunkt (DN), sowie die jeweiligen gleichaltrigen Kontrollgruppen (Co), n = 4 bis 11 je Gruppe.

3.2.9 Renale Zellschädigung und Fibrosierung

Mithilfe der mRNA-Expressionsanalyse wurde zudem das Ausmaß der renalen Zellschädigung und Fibrosierung überprüft. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass im Vergleich zu ihren Kontrollgruppen in den diabetischen Wildtyp- und A20+/- Mäusen ein vermehrter tubulärer Schaden vorlag, mit tendenziell verstärkter renaler Expression der tubulären Schadensmarker Kim-1 und Ngal in diabetischen Wildtyp-Versuchstieren und signifikant erhöhter Expression beider Marker in diabetischen A20+/- Mäusen gegenüber A20+/- Kontrollen (jeweils p < 0,001). Im Vergleich diabetischer Wildtyp- mit A20+/- Versuchstieren zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied der renalen Kim-1- oder Ngal-mRNA-Expression (Abbildung 45A).

Zur Charakterisierung der renalen Fibrosierung wurde die mRNA-Expression der extrazellulären Matrixmoleküle Prokollagen 1, Prokollagen 4, Fibronectin, Laminin, der Fibrosemediatoren Ctgf und Tgf- β , sowie der Fibroblastenmarker α -Sma und Fsp-1 bestimmt (Abbildung 45B). Während alle Fibrosemarker in den Kontrollgruppen nur in einem geringen Ausmaß und vergleichbar exprimiert wurden, führte die diabetische Nierenschädigung zu ihrer gesteigerten renalen Expression. So wurden im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe in diabetischen Wildtyp-Tieren signifikant vermehrt Fibronectin (p = 0,009), Tgf- β (p = 0,016) und α -Sma (p = 0,022) exprimiert, mit tendenziell nicht signifikanter Expressionssteigerung auch der übrigen Marker. Diabetische A20+/- Versuchstiere wiesen gegenüber A20+/- Kontrollen eine noch deutlichere Expressionssteigerung der Fibrosemarker auf, mit einer signifikant vermehrten renalen mRNA-Expression von Prokollagen 1 (p = 0,0002), Prokollagen 4 (p < 0,0001), Fibronectin (p < 0,0001), Laminin (p = 0,0001), Ctgf (p < 0,0001), Tgf- β (p < 0,0001), α -Sma (p < 0,0001) und Fsp-1 (p < 0,0001). Insbesondere wiesen diabetische A20+/- Mäuse eine signifikant verstärkte renale Expression aller untersuchten Fibrosemarker im Vergleich zu diabetischen Wildtyp-Versuchstieren auf (Prokollagen 1: p = 0,001; Prokollagen 4: p = 0,0004; Fibronectin: p = 0,0005; Laminin: p = 0,045; Ctgf: p = 0,007; Tgf- β : p < 0,0001.; α -Sma: p = 0,002; Fsp-1: p < 0,0001) (Abbildung 45B).

Diese Expressionsanalysen weisen somit trotz des vergleichbaren tubulären Schadens in diabetischen Wildtyp- und A20+/- Versuchstieren einen signifikant stärkeren fibrotischen Gewebeumbau in geschädigten Nieren der A20+/- Versuchsgruppe nach. Diese verstärkte Fibrose korreliert mit der vermehrten renalen Entzündung und tubulointerstitiellen Makrophageninfiltration in diabetischen A20+/- Mäusen im Vergleich zu diabetischen Wildtyp-Tieren.



Β



Abbildung 45: Evaluation der renalen Zellschädigung und Fibrosierung im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp (WT) und A20+/-, sowie den jeweiligen unbehandelten Kontrollgruppen Untersuchung der renalen Zellschädigung und Fibrosierung durch renale mRNA-Expressionsanalyse an dem zum Versuchsendpunkt in Woche 27 entnommenen Nierengewebe. Dargestellt ist die auf 18S rRNA und Gapdh bezogene relative mRNA-Expression in Relation zum WT von (A) Kidney Injury Molecule-1 (Kim-1) und Neutrophilengelatinase-assoziiertem Lipocalin (Ngal) als Marker der proximal tubulären bzw. distal tubulären Zellschädigung und (B) den Fibrosemarkern Prokollagen 1, Prokollagen 4, Fibronectin, Laminin, Connective Tissue Growth Factor (Ctgf), Transforming Growth Factor β (Tgf- β), α -Smooth Muscle Actin (α -Sma) und Ferroptosis Suppressor Protein 1 (Fsp-1). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM aller Versuchstiere mit einer erfolgreichen Diabetesinduktion und Überleben bis zum Versuchsend-punkt (DN), sowie die jeweiligen gleichaltrigen Kontrollgruppen (Co), n = 4 bis 11 je Gruppe.

3.2.10 Zusammenfassung der Phänotypanalyse A20-defizienter Mäuse im Modell der diabetischen Nephropathie

Die Induktion des Diabetes in den Wildtyp- und A20+/- Versuchstieren verlief erfolgreich, worauf ein signifikant erhöhter Blutglukosespiegel und HbA1c-Wert im Vergleich zu den Kontrollgruppen des gleichen Genotyps, bei der keine Intervention stattgefunden hatte, hinwies. Zudem unterschieden sich die diabetischen Wildtyp- und A20+/- Tiere bei vergleichbaren Blutglukosespiegeln im Verlauf und gleichen HbA1c-Werten am Versuchsende nicht in ihrer hyperglykämen Stoffwechsellage. Auch die Mortalität war in den beiden diabetischen Versuchsgruppen nicht signifikant verschieden, der Gewichtsverlauf im Versuchszeitraum identisch. Diese Daten sprechen für eine vergleichbare Hyperglykämie als Ursache der diabetischen Nierenschädigung in Wildtypund A20+/- Versuchstieren.

Die Beurteilung der Nierenfunktion ergab beim Vergleich der diabetischen Versuchsgruppen mit ihrer jeweiligen Kontrollgruppe eine tendenzielle Verschlechterung der glomerulären Filtrationsrate und Albuminurie, sowie ein signifikanter Anstieg im Plasmaharnstoff am Versuchsende in Woche 27. Diese funktionellen Daten der diabetischen Nierenschädigung unterschieden sich jedoch nicht zwischen diabetischen Wildtyp- und A20+/- Versuchstieren. Zudem entwickelten die diabetischen Mäuse beider Genotypen in Folge der bestehenden proteinurischen Nierenerkrankung eine signifikante Hypoalbuminämie, die diabetischen A20+/- Versuchstiere auch eine signifikante Hypoproteinämie. Eine signifikante Hypercholesterinämie trat dagegen in keiner der beiden diabetischen Versuchsgruppen auf, bei diabetischen A20+/- Mäusen lagen tatsächlich auch gegenüber ihren unbehandelten Kontrollen erniedrigte Cholesterinwerte vor, deren Ursache unklar ist. Die ansonsten zwischen diabetischen Wildtyp- und A20+/- Versuchstieren vergleichbaren funktionellen Parametern der Nierenschädigung wiesen jedoch auf eine ähnliche Ausprägung der diabetischen Nephropathie in den beiden Genotypen hin.

Entsprechend zeigte die histologische Auswertung beginnende strukturelle Veränderungen der diabetischen Nephropathie mit Nachweis einer glomerulären Größenzunahme, jedoch keinen Unterschied zwischen diabetischen Wildtyp- und A20+/- Versuchstieren. Auch eine vergleichbare mRNA-Expression der tubulären Schadensmarker Kim-1 und NGAL wies auf eine vergleichbare Nierenschädigung in den beiden Genotypen hin. Das Ausmaß des renalen Zelltods war ebenfalls sowohl glomerulär als auch im Tubulointerstitium der diabetischen Versuchstiere beider Genotypen vergleichbar.

Die renale Inflammation betreffend ergab die durchflusszytometrische Analyse eine vergleichbare renale Leukozytenakkumulation in den diabetischen Wildtyp- und A20+/- Versuchstieren. Immunhistologisch konnte jedoch in diabetischen A20+/- Mäusen im Vergleich zum diabetischen Wildtyp eine verstärkte tubulointerstitielle Infiltration der ERHR3+ Makrophagenpopulation, die in der Durchflusszytometrie nicht untersucht wurde, demonstriert werden. Auch glomerulär wiesen diabetische A20+/- Tiere eine tendenziell, jedoch nicht signifikant vermehrte Zahl ERHR3+ Makrophagen auf. Die mRNA-Expressionsanalyse renaler Entzündungsmediatoren wies einerseits bei vermehrter Expression einiger inflammatorischer Chemokine und Zytokine die verstärkte renale Entzündung in diabetischen Tieren beider Genotypen im Vergleich zu ihren Kontrolltieren nach. Zudem zeigte sich in diabetischen A20+/- Versuchstieren im Vergleich zum diabetischen Wildtyp eine signifikant höhere renale mRNA-Expression einzelner Entzündungsmediatoren, was mit der gesteigerten renalen Infiltration von ERHR3+ Makrophagen korrelierte. Auch die mRNA-Expression mehrerer renaler Fibrosemarker war in den diabetischen Wildtyp- und A20+/- Mäusen gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren erhöht. Korrelierend mit der verstärkten renalen Entzündungsaktivität wiesen diabetische A20+/- Mäuse im Vergleich zum diabetischen Wildtyp eine signifikant höhere renale Expression fibrotischer Markergene auf.

Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass A20-Defizienz im Verlauf der diabetischen Nephropathie zwar nicht zu vermehrtem renalen Zelltod führt, jedoch eine verstärkte renale Entzündung mit vermehrter Infiltration renaler Makrophagen und erhöhter Expression proinflammatorischer Chemokine und Zytokine bewirkt. Dies ist zusätzlich mit einem vermehrten fibrotischen Gewebeumbau der geschädigten Nieren verbunden. In den hier untersuchten Versuchsgruppen führte die vermehrte renale Entzündung und Fibrose in A20-defizienten Mäusen allerdings nicht zu einer Verschlechterung funktioneller und struktureller Marker der diabetischen Nierenschädigung. Dies könnte allerdings in den Charakteristika des verwendeten diabetischen nehropathiemodells begründet sein, in dem sich im hier untersuchten Zeitraum von 27 Wochen nur ein milder diabetischer Nierenschaden entwickelt.

4. Diskussion

Zelltod ist ein lebenswichtiger Vorgang im Körper, bei dem es zum irreversiblen Aussetzen des Stoffwechsels einer Zelle kommt. Dieser Prozess kann einerseits physiologisch auftreten mit Funktionen in der Embryonalentwicklung aller Lebewesen, wie auch im späteren Leben im Ersetzen alter Zellen zur Erneuerung von Gewebe. Dabei muss ein Gleichgewicht zwischen Zellwachstum und Zelltod bewahrt werden, da dessen Störung zu Erkrankungen wie Tumore oder Degenerationen führen kann. Des Weiteren kann eine pathologische Form des Zelltods auftreten. Ausgelöst wird dieser Prozess durch äußere Faktoren im Rahmen von Zellstress wie mechanischer Verletzungen, Hypoxie, Toxine, Hyper-/Hypothermie oder durch Krankheitserreger. Die bekanntesten Mechanismen des Zelluntergangs sind die Apoptose als regulierte und kontrollierte Form, sowie die Nekrose als unregulierte Form mit einhergehender Entzündungsreaktion. Während in der Vergangenheit davon ausgegangen wurde, dass nur einer dieser Mechanismen ablaufen kann, stellen diese zwei Zelltodformen heute eher zwei Extreme eines Kontinuums dar (38). Zudem wurden seit dem letzten Jahrzehnt weitere Formen des Zelltods entdeckt, wie die Nekroptose. Als eine nekrotische Zelluntergangsform, die einerseits zellulär reguliert abläuft und andererseits mit einer Entzündungsreaktion einhergeht, wurde sie seither in zahlreichen Krankheitsmodellen erforscht (44-57).

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der Nekroinflammation bei der Progression der diabetischen Nephropathie zu untersuchen. Vorarbeiten zeigen, dass die diabetische Nephropathie mit einem glomerulären Zelluntergang einhergeht. Bisher lag der Fokus der Untersuchungen in diesem Zusammenhang auf der potenziellen Rolle der Apoptose (118, 119). Neuere Erkenntnisse weisen allerdings darauf hin, dass entzündliche Mechanismen zur renalen Schädigung bei der diabetischer Komponente wie die Nekroptose eher eine pathophysiologische Rolle bei der diabetischen Nierenschädigung spielen könnten. Zudem wird diese Annahme durch den fehlenden Anhalt für eine funktionelle Rolle von Caspase 3 in der diabetischen Nephropathie, welcher Bestandteil der vermittelnden Signalkaskade der Apoptose ist, unterstützt (120).

Bisher ist noch keine Untersuchung der Nekroptose bei der diabetischen Nephropathie erfolgt. Daher wurde für diese Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass auch die Nekroptose pathophysiologisch zur diabetischen Nephropathie als eine renale Schädigung mit Entzündungskomponente beiträgt. Folglich würde bei Ausfall oder Reduzierung der Nekroptose verminderter renaler Zelluntergang, eine reduzierte Inflammation und ein verbesserter Verlauf der renalen Schädigung auftreten. Wichtige intrazelluläre Proteine, die die Nekroptose vermitteln sind die RIP1- und RIP3-Kinasen sowie das Effektormolekül MLKL. Aus diesem Grund wurde im ersten Teil der Arbeit die Progression der diabetischen Nephropathie im Mausmodell bei Fehlen der Ripk1- oder der Ripk3-Kinaseaktivität sowie bei Fehlen der Pseudokinase Mlkl charakterisiert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Protein A20 als negativer Regulator der nekroptotischen Aktivität und Entzündung untersucht. Diesem Teilprojekt lag die Hypothese zugrunde, dass bei Fehlen dieses antiinflammatorischen und antinekroptotischen Proteins mit Ausfall seiner negativregulatorischen Feedback-Funktion die Progression der diabetischen Nephropathie verstärkt wird und bei A20-Defizienz eine gesteigerte renale Schädigung auftritt (86).

4.1 Erfolgreiche Diabetesinduktion in allen Versuchsgruppen

Für die Untersuchung der Nekroinflammation im diabetischen Nephropathie-Modell musste den Versuchstieren eine chronische diabetische Stoffwechsellage induziert werden. In dieser Arbeit wurde die Methode des STZ-induzierten Diabetes gewählt, der in allen Versuchsgruppen (Ripk1kd-, Ripk3kd-, Mlkl-/- und A20+/- Mäuse), wie auch in ihren jeweiligen Wildtyp-Kontrollen ausgelöst werden konnte.

In der Literatur werden eine Reihe an unterschiedlichen Tiermodellen zur Untersuchung der Pathophysiologie und der Folgen des Diabetes mellitus beschrieben. Zum einen werden Modelle mit genetisch veränderten Mäusen genutzt. So werden non-obese diabetic Mäuse (NOD) durch ein spontanes Auftreten einer Insulitis und einer daraus folgenden Schädigung der ß-Zellen häufig als Modell für einen Diabetes Typ 1 verwendet (121), während unter anderem db/db-Mäuse durch Übergewicht und einer sich spontan entwickelnden Insulinresistenz als Tiermodell eines Diabetes Typ 2 genutzt werden (122). Daneben gibt es Methoden für die chemische Induktion eines Diabetes mellitus. Die bekanntesten Toxine sind dabei das STZ (123) und Alloxan (124). Der große Vorteil einer chemischen Induktion liegt darin, dass bei Untersuchungen an genetisch veränderten Versuchstieren keine Einkreuzung erfolgen muss. Allerdings birgt diese Methode auch einige Schwierigkeiten. Die Sensitivität gegenüber dem Diabetes-induzierenden Toxin basiert auf zahlreichen zum Teil auch unbekannten Einflussfaktoren. Es konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Mauslinien unterschiedlich stark auf das Toxin reagieren. In der vorliegenden Arbeit wurden Mauslinien mit gleichem C57BL/6-Hintergrund verwendet, welcher als `high responder' gilt (125). Des Weiteren spielt das Geschlecht eine wichtige Rolle, sodass in dieser Arbeit einheitlich nur männliche Versuchstiere gleichen Alters untersucht wurden (126). Zudem wurde auf eine gleiche Dosierung und Applikation des Toxins sowie eine gleiche Diät geachtet. Es sind unterschiedliche STZ-Injektionsschemata in der Literatur beschrieben. Einerseits kann, wie in dieser Arbeit verwendet, das STZ in mehreren niedrigen Dosen appliziert werden oder eine einmalige Injektion mit einer höheren Dosierung erfolgen. Da eine höhere Mortalität in der hohen Dosierung beschrieben wurde, erfolgte die STZ-Gabe hier nach ersterer Methode (127).

Grundsätzlich wurden möglichst stark übereinstimmende Versuchsbedingungen geschaffen. Nicht beeinflussbar waren dabei mögliche Unterschiede im genetischen Hintergrund der einzelnen transgenen Mauslinien, welche trotz des gleichen Stammhintergrunds C57BL/6 zu unterschiedlichem Ansprechen auf STZ führen können (128). In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass nach einem Applikationszyklus von fünf Tagen die Wildtyp-Versuchsgruppe zu 100% einen Diabetes entwickelte, während die transgenen Mäuse Ripk1kd (50%), Ripk3kd (76,9%) und Mlkl-/- (41,7%) eine geringere Ansprechrate aufwiesen. Diese Unterschiede könnten zum einen an einem möglichen Schutz vor einer STZ-induzierten Nekroptose im Pankreasgewebe liegen. Die potenzielle Beteiligung anderer Zelltodformen am Zelluntergang der ß-Zellen im Pankreas neben der Apoptose wurden in der Literatur bereits diskutiert (129). Die Tatsache, dass die Mlkl-/- Versuchstiere mit einer Defizienz des Effektormoleküls der Nekroptose am wenigsten sensitiv auf das Toxin reagieren, würde diese These unterstützen. Im zweiten Teil der Arbeit wurde jedoch gezeigt, dass diese Vermutung widerlegend der Wildtyp eine 100% Diabetes-Induktionsrate aufwies, die A20+/- Versuchsgruppe mit Defizienz des Nekroptose-hemmenden A20 Moleküls jedoch nur eine Ansprechrate von 83,3%. Somit könnten einige Submauslinien auch aufgrund weiterer unbekannter Einflussfaktoren weniger gut auf die Diabetes-Induktion ansprechen. Dennoch konnten in allen Versuchsgruppen eine diabetische Stoffwechsellage in einer ausreichenden Zahl an Tieren erfolgreich induziert werden. In die nachfolgenden Untersuchungen der diabetischen Nierenschädigung wurden nur Versuchstiere mit einem HbA1c > 5,0% am

Versuchsende einbezogen. In beiden Teilprojekten hatten hierbei die ausgewerteten diabetischen Wildtyp- und transgenen Versuchstiere eine vergleichbare hyperglykäme Stoffwechsellage, verdeutlicht durch ähnliche mittlere Blutzuckerwerte im Versuchsverlauf und nicht signifikant unterschiedliche HbA1c-Werte der Versuchsgruppen am Versuchsende. Mögliche Unterschiede im renalen Phänotyp waren somit nicht durch eine unterschiedliche Exposition der Versuchsgruppen gegenüber dem diabetischen Milieu erklärt.

4.2 Mortalität und Gewichtsverlauf nach der STZ-Injektion

Bei Analyse der Mortalität zeigte sich, dass moribunde Tiere im Wesentlichen ab Woche 12 nach STZ-Injektion euthanasiert werden mussten. Dabei war die Sterberate im Wildtyp tendenziell am höchsten, gefolgt von den Ripk1kd-, Mlkl-/- und den Ripk3kd-Mäusen. Im zweiten Teil dieser Arbeit lag die Sterberate des Wildtyps ebenfalls über der Mortalität der transgenen A20+/- Mäuse.

STZ als ein Medikament, welches anfangs gegen Tumore und Bakterien entwickelt wurde, hat auch toxische Wirkungen. Neben der Schädigung der ß-Zellen im Pankreas beeinflusst STZ auch das Nervensystem, das kardiovaskuläre System, das respiratorische System sowie weitere Organe (130). So konnten Kume et al. hepatische Veränderungen in Mäusen nach einer Diabetesinduktion durch STZ nachweisen (131). Damit stellte sich die Frage nach der Todesursache der Versuchstiere, welche sowohl in der Toxizität des Medikaments an sich oder den Folgen der Hyperglykämie liegen könnte. Bei Betrachtung der Zeitpunkte der notwendigen Euthanasien sprachen diese allerdings eher für die Folge der diabetischen Stoffwechsellage. Auch Deeds et al. gehen davon aus, dass Folgen durch die Intervention an sich und die Toxizität von STZ bereits zu einer Mortalität innerhalb der ersten zehn Tage nach Beginn der Diabetesinduktion führen würden (128). Die Mortalität der Versuchstiere in dieser Arbeit, die erst ab Woche 4 auftrat, ist somit vor allem auf die bestehende hyperglykäme Stoffwechsellage zurückzuführen. Mit dieser Annahme konnte das Uberleben der Versuchstiere als ein Maß für die Toleranz der Versuchsgruppen gegenüber der hyperglykämen Stoffwechsellage oder dem Auftreten von Blutzuckerspitzen gewertet werden. Hierbei ist zu erkennen, dass im Vergleich zu den transgenen Mauslinien jeweils die Wildtyp-Gruppen den schlechtesten Verlauf aufwiesen. Es ist nicht auszuschließen, dass die moribunden Tiere im vorangegangenen Verlauf auch tendenziell höhere Blutzuckerspiegel aufgewiesen haben. Allerdings wurde bei den moribunden Tieren vor der Euthanasie keine Blutabnahme zur Messung des HbA1c-Wertes durchgeführt, um dies zu untersuchen. Zudem ist zu beachten, dass die Mortalitätsunterschiede zwischen den Versuchsgruppen in beiden Teilprojekten nicht signifikant waren. Ob Ripk1kd-, Ripk3kd-, Mlkl-/- oder A20+/- Mäuse tatsächlich eine höhere Toleranz gegenüber einer chronisch hyperglykämen Stoffwechsellage als Wildtyp-Mäuse aufweisen und mögliche zugrundeliegende Mechanismen müssten daher in weiteren Untersuchungen analysiert werden.

Der Gewichtsverlauf der in dieser Arbeit untersuchten Versuchsgruppen zeigte in den meisten Gruppen einen initialen Abfall des Körpergewichts der Versuchstiere in der ersten Woche nach der Diabetesinduktion. Dieser Gewichtsverlust nach STZ-Injektion wurde auch von Deeds et al. berichtet (128). Wie von Dekel et al. beschrieben stabilisiert sich das Körpergewicht nach einiger Zeit wieder, blieb teilweise auf gleichem Niveau (132), oder nimmt zum Teil wieder zu (133). Das Ausmaß der Reduktion im Gewicht hängt dabei von mehreren Faktoren ab. Zum einen zeigte sich, dass die Diabetesinduktion durch eine einzelne Applikation einer hohen Dosis von STZ zu

einem vermehrten Gewichtsabfall führt als mehrere Injektionen einer geringeren Dosis. Des Weiteren spielt auch das Ausgangsgewicht eine wichtige Rolle, da gezeigt werden konnte, dass besonders schwere Tiere prozentual weniger an Gewicht verloren (132).

Die Analyse des Gewichtsverlaufs der Ripk1kd-, Ripk3kd- und Mlkl-/- Versuchsgruppen verglichen mit dem Wildtyp ergab eine stärkere Gewichtszunahme der Ripk1kd- und Ripk3kd-Mäuse. Da bei allen Versuchstieren dasselbe Injektionsschema genutzt wurde und zudem alle Tiere ein sehr ähnliches durchschnittliches Ausgangsgewicht von 25 g aufwiesen, ist zu vermuten, dass die unterschiedlichen Gewichtsverläufe nicht auf äußeren Faktoren basieren. Somit könnte der bessere Verlauf bei den Ripk1kd- und Ripk3kd-Mäusen bei gleicher diabetischer Stoffwechsellage darauf hinweisen, dass Ripk1kd- und Ripk3kd-Mäuse metabolisch die induzierte Hyperglykämie besser tolerieren. Mlkl-/- Mäuse zeigten einen den Wildtyp-Tieren vergleichbaren Gewichtsverlauf. Allerdings wurde ein Teil der Mlkl-/- Mäuse zweimalig über fünf Tage mit STZ gespritzt, um eine ausreichend hyperglykäme Stoffwechsellage zu erreichen. Der doppelte Stress, dem diese Tiere ausgesetzt wurden, könnte somit einen an sich verbesserten Gewichtsverlauf verschleiern.

Der Vergleich der Gewichtsverläufe von den A20+/- Versuchstieren und ihrer Wildtyp-Gruppe zeigte bei vergleichbarem Ausgangsgewicht ähnliche Werte, sodass von einem vergleichbaren metabolischen Status beider Versuchsgruppen ausgegangen werden kann.

4.3 Verlauf der diabetischen Nephropathie in Ripk1kd-, Ripk3kd- und Mlkl-/- Mäusen

4.3.1 Möglicher nephroprotektiver Effekt einer Mlkl-Defizienz bei diabetischer Nierenschädigung

Die Untersuchung der Mlkl-/- Versuchstiere im Modell der diabetischen Nephropathie ergab zum Versuchsende eine verminderte Hypoalbuminämie und Hypercholesterinämie, als Hinweis auf eine mögliche geringere Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere. Allerdings waren weitere funktionelle Nierenparameter wie die GFR, Harnstoffwerte und Albuminurie nicht verändert. Vereinbar mit einer geringeren glomerulären Schädigung und Hyperfiltration konnten bei Mlkl-Defizienz signifikant kleinere Glomeruli objektiviert werden, korrelierend mit einer signifikant verminderten glomerulären, allerdings keiner unterschiedlichen tubulointerstitiellen Infiltration von T-Lymphozyten und Makrophagen. Passend hierzu zeigte sich eine reduzierte renale Expression einzelner Entzündungsmediatoren wie Tnf- α und II-10 sowie dem extrazellulären Matrixprotein Laminin in diabetischen Mlkl-/- Mäusen. Interessanterweise konnten bei den Untersuchungen entgegen der aufgestellten Hypothese keine Unterschiede im Ausmaß des renalen Zelltods zwischen Wildtyp-Versuchstieren und den Mlkl-defizienten Mäusen nachgewiesen werden.

Die Funktion von MLKL wurde bereits an einer Reihe weiterer Nephropathiemodellen untersucht, wobei jeweils der Fokus auf seiner Rolle als Effektormolekül der Nekroptose lag. In Modellen des akuten Nierenversagens (AKI) konnten Mulay et al. im Oxalat-induzierten AKI-Modell (134) und Martin-Sanchez et al. im Folsäure-induzierten Modell (135) eine Reduktion von Zelltod bei Mlkl-Defizienz nachweisen. Im Ischämie-Reperfusionsmodell zeigte sich bei Xu et al. (136) wie auch bei Chen et al. (56) neben dem verminderten Zelltod zudem eine reduzierte Inflammation bei Mlkl-Defizienz.

Im Cisplatin-induzierten AKI-Modell beschreiben Xu et al. in dem am meisten durch die Nekroptose geschädigten Nierenkompartiment einen verminderten tubulointerstitiellen Zelltod und eine reduzierte Entzündungsreaktion bei MIkI-Hemmung, mit Nachweis vermindert exprimierter inflammatorischer Zytokine in proximalen Tubuluszellen (136). Auch ging in Zellkultur die Inhibition von MLKL durch Necrosulfonamid mit einem reduzierten Zelltod in tubulären Epithelzellen einher (137).

Eine verminderte Schädigung im Tubulointerstitium bei Mlkl-Defizienz konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden, obwohl sich auch in diesem Kompartiment eine tendenziell reduzierte Infiltration von Entzündungszellen zeigte. Tatsächlich ergab sich in der vorliegenden Arbeit vor allem eine nephroprotektive Rolle der Mlkl-Defizienz in den Glomeruli, bei Hinweisen auf eine geringere Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere, geringere glomeruläre Größenzunahme und korrelierend eine verminderte glomeruläre Infiltration von T-Lymphozyten und Makrophagen. Die verminderte Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere lässt an eine reduzierte Schädigung der Podozyten denken, passend zum bekannten Pathomechanismus der diabetischen Nephropathie (21). Mechanismen des podozytären Zelltods im Verlauf der diabetischen Nephropathie sind bisher noch nicht abschließend geklärt. Allerdings gibt es Hinweise, dass er nicht allein auf dem Vorgang der Apoptose beruht (138). Xu et al. konnten zeigen, dass die Nekroptose eine größere Rolle beim Zelluntergang von Podozyten als die Apoptose spielt. Zudem verbesserte eine Inhibition der Nekroptose das Überleben von Podozyten unter hyperglykämen Bedingungen (139). Im vorliegenden Modell scheint der Schutz der Podozyten allerdings nicht wesentlich zur Nephroprotektion beizutragen, da das Ausmaß des glomerulären Zelltods durch Mlkl-Defizienz nicht beeinflusst wurde.

Tatsächlich konnte weder in Glomeruli noch im tubulointerstitiellen Kompartiment ein reduzierter Zelltod bei Mlkl-Defizienz im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden, jedoch eine geringere renale Entzündung. Dies weist darauf hin, dass in dem hier untersuchten diabetischen Nephropathiemodell keine oder eine nicht ausreichend starke und somit kaum detektierbare Nekroptose abläuft. Bei den Versuchsmodellen mit nachgewiesener Nekroptose und ihrer Reduktion durch Mlkl-Defizienz handelt es sich vor allem um Nephropathiemodelle mit einem akuten Verlauf und einer fulminanten Entzündungsreaktion. Chronische Nephropathiemodelle wurden bisher wenig untersucht.

Somit scheint die pathophysiologische Rolle von MLKL in dem hier untersuchten Nephropathiemodell nicht auf der Vermittlung von Nekroptose oder anderen Zelltodformen zu basieren, sondern auf proinflammatorischen Effekten zu beruhen. Dies weist auf Nekroptose-unabhängige Funktionen von MLKL hin. Tatsächlich konnte beispielsweise eine RIPK3-unabhängige Phosphorylierung von MLKL beschrieben werden, die den Abbau von Myelinscheiden nach einer Axotomie fördert (140). Auch eine Nekroptose-unabhängige MLKL-Funktion bei der Demyelinisierung im Verlauf der Multiplen Sklerose (141) oder einer hepatozellulären Schädigung bei nicht-alkoholischer Fettlebererkrankung (142) konnten gezeigt werden. Zudem wird MLKL mit nekroptoseunabhängigen Effekten bei Fortschreiten und der Metastasierung von Tumoren in Verbindung gebracht (143). Auch im renalen Modell der nephrotoxischen Serumnephritis ließ sich in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe aufgrund eines tendenziellen, jedoch nicht signifikant reduzierten renalen Zelltods, aber einer signifikant verminderten glomerulären Makrophageninfiltration bei MIkl-Defizienz im Gegensatz zu Ripk3kd-Mäusen eine zusätzliche RIPK3-unabhängige Funktion von MLKL vermuten (144). Andere Zelltod-unabhängige Rollen von MLKL in Bezug auf renale Schädigungen wurden bisher nicht beschrieben. Die genauen Pathomechanismen der Nekroptose-unabhängigen Funktionen von MLKL sind derzeit noch unklar, lassen sich aber bis zum heutigen Kenntnisstand grob in drei mögliche Kategorien aufteilen: Beteiligung an anderen regulierten Zelltodformen, Translokation in den Nukleus zur Veränderung der Genexpression und Bindung an Lipide, um Bakterien zu schädigen oder einen bestimmten Stoffwechselprozess zu hemmen (78) (Abbildung 46). Ihre Relevanz bezüglich des antiinflammatorischen Effekts in dem hier untersuchten diabetischen Nephropathiemodells ist jedoch unklar.



Abbildung 46: Nekroptose-unabhängige Funktionen von MLKL (78)

4.3.2 Effekte der fehlenden Kinaseaktivität von Ripk1 und Ripk3 bei der diabetischen Nephropathie

Im Vergleich zu der diabetischen Mlkl-defizienten Versuchsgruppe ergab sich kein nephroprotektiver Effekt bei den diabetischen Ripk1kd- und Ripk3kd-Mäusen. Es zeigte sich jedoch eine reduzierte Dyslipidämie in der Ripk1kd-Gruppe, mit verminderter Hypercholesterinämie. Zudem konnte hinsichtlich der Inflammation in einzelnen untersuchten Parametern wie der glomerulären und tubulointerstitiellen Makrophageninfiltration oder der renalen Expression einzelner Entzündungsmediatoren eine signifikante Reduktion in diabetischen Ripk1kd- oder Ripk3kd-Versuchstieren im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden. Allerdings ging dies nicht mit reduzierten renalen Schadensmarkern einher.

Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei Shi et al., die komplett Ripk3-defiziente Versuchstiere im STZ-induzierten Diabetesmodell untersuchten (145). Die Autoren beschreiben eine vergleichbare Albuminurie und Glomerulosklerose in Ripk3-/- und Wildtyp-Mäusen, so dass nicht nur das Fehlen der Ripk3-Kinaseaktiviät, sondern auch eine komplette Ripk3-Defizienz keinen Einfluss auf den Verlauf der diabetischen Nierenschädigung hat. Dennoch wiesen diabetische Ripk3-/- Mäuse eine signifikant reduzierte renale mRNA-Expression von F4/80 auf, sowie histologisch eine ten-

denziell verminderte Infiltration tubulointerstitieller F4/80+ Makrophagen (145). Mit diesen Ergebnissen übereinstimmend konnte in der vorliegenden Arbeit in den diabetischen Ripk3kd-Mäusen ebenfalls eine reduzierte renale Infiltration ERHR3+ Makrophagen nachgewiesen werden, wobei allerdings hier die interstitielle F4/80+ Makrophageninfiltration mit Wildtypmäusen vergleichbar war. Tendenziell reduzierte ERHR3+ Makrophageninfiltrate lagen auch in den Nieren der diabetischen Ripk1kd-Mäuse vor. Interessanterweise beschreiben Shi et al. zusätzlich eine deutlich verminderte renale Fibrose in Ripk3-/- Mäusen, mit reduzierter mRNA-Expression fibrotischer Markergene und immunhistologisch geringerer Akkumulation extrazellulärer Matrixmoleküle im Tubulointerstitium (145). Die Autoren postulieren eine zugrundeliegende RIPK3-induzierte NLRP3-Inflammasom-vermittelte renale Fibrose im Verlauf der diabetischen Nierenschädigung, unabhängig von der Nekroptose-induzierenden Funktion. Die hier vorgestellten Daten zeigen jedoch eine vergleichbare renale mRNA-Expression fibrotischer Marker in diabetischen Ripk3kdund Wildtyp-Mäusen. Hieraus kann geschlussfolgert werden, dass die Kinaseaktivität von RIPK3 offenbar nicht die möglichen profibrotischen Effekte dieses Moleküls vermittelt. Ebenso wurde in diabetischen Ripk1kd-Mäusen das Ausmaß der renalen Fibrose nicht beeinflusst.

Ähnlich wie in den Mlkl-defizienten Mäusen führte auch die fehlende Kinaseaktivität von Ripk1 und Ripk3 in diabetischen Ripk1kd- und Ripk3kd-Mäusen zu keiner Reduktion des renalen Zelltods und der renalen Schädigung im Vergleich zum Wildtyp. Dies ist diskrepant gegenüber den in der Literatur beschriebenen, vor allem akuten Nephropathiemodellen, in denen eine Hemmung der Nekroptosesignalkaskade zu reduziertem Zelluntergang und verminderter renaler Schädigung führt. Dies konnte unter anderem im Ischämie-Reperfusionsmodell durch Linkermann et al. (146), im Cisplatin-induziertem AKI-Modell durch Xu et al. (136) oder in einem Lupusnephritis-Modell durch Guo et al. (147) nachgewiesen werden. Somit verdichten sich die Hinweise, dass im vorliegenden diabetischen Nephropathie-Modell die Nekroptose keine wesentliche pathophysiologische Rolle zu spielen scheint. Eine Ursache hierfür könnte darin liegen, dass diese vor allem in akuten Nephropathiemodellen mit starker Parenchymschädigung abläuft, während nekroptotischer Zelltod bei chronisch-progredienter Nierenschädigung keine wesentliche funktionelle Rolle spielt.

Übereinstimmend mit publizierten Daten ergeben sich in dieser Arbeit jedoch in Ripk1kd- und Ripk3kd-Mäusen Hinweise auf eine reduzierte Entzündungsaktivität, in den vorliegenden Ergebnissen auffallend durch eine Reduktion an glomerulären und tubulointerstitiellen ERHR3+ Makrophageninfiltration sowie einer verminderten renalen Expression einzelner Entzündungsmediatoren. Eine reduzierte Inflammation wurde beispielsweise bei RIPK3-Hemmung durch reduzierte IL-1β Expression (145, 147, 148) und verminderte Neutrophileninfiltration (149) nachgewiesen. Allerdings waren diese Effekte mit verminderter Nekroptose assoziiert. Die genetische Kinase-Inaktivierung in Ripk1kd- und Ripk3kd-Mäusen sollte somit bei nicht nachweisbarer Reduktion von Zelltod auch keine reduzierte Nekrose-induzierte Inflammation (Nekroinflammation) nach sich ziehen. Damit ergeben sich in dieser Arbeit Hinweise, dass RIPK1 und RIPK3 mit ihrer Kinaseaktivität neben der Nekroptose auch direkt zelltodunabhängige Inflammation vermitteln können. Tatsächlich wiesen Martin-Sanchez et al. bereits nekroptoseunabhängige proinflammatorische Effekte von RIPK3 im Folsäure-induzierten AKI-Modell nach, jedoch lag hier eine komplette Ripk3-Depletion vor (150). Auch Newton et al. konnten nach Inaktivierung von RIPK1 und RIPK3 weitere nekroptoseunabhängige Funktionen dieser Moleküle charakterisieren, da ihre Hemmung oder Depletion zu einem stärker abgemilderten Verlauf im Ischämie-Reperfusions-induzierten AKI-Modell führte als eine MlkI-Depletion mit blockierter Nekroptose (151).

4.4 Verlauf der diabetischen Nephropathie in A20-defizienten Versuchstieren

4.4.1 A20-Defizienz verstärkt renale Entzündungsaktivität und fibrotischen Gewebeumbau ohne deutliche Verschlechterung der diabetischen Nierenschädigung

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Effekt eines Proteins mit inhibitorischer Wirkung auf Entzündung und Nekroptose untersucht. A20 interagiert mit RIPK1 sowie RIPK3 und hemmt damit die Signaltransduktion der Nekroptose (86, 89). Zudem hat A20 antiinflammatorische Wirkungen. Somit sollte bei einer Defizienz dieses Proteins ein gesteigerter renaler Schaden im diabetischen Modell auftreten.

Die erarbeiteten Ergebnisse zeigen, dass diabetische Wildtyp- und A20+/- Versuchstiere bei vergleichbarer diabetischer Stoffwechsellage Zeichen der diabetischen Nierenschädigung entwickelten. Allerdings waren die funktionellen und strukturellen Marker der diabetischen Nephropathie in A20-defizienten Mäusen mit dem Wildtyp vergleichbar, bei ähnlicher glomerulärer Filtrationsrate und Plasmaharnstoffwerten am Versuchsende, vergleichbarer Albuminurie, Hypoalbuminämie und Hypoproteinämie sowie ähnlicher Größenzunahme der Glomeruli. Auch konnte keine deutliche Zunahme nekrotischer Zellen in den diabetischen Versuchstieren gesehen werden, deren Zahl in beiden Genotypen vergleichbar war. Dagegen wiesen diabetische A20+/- Mäuse im Vergleich zum diabetischen Wildtyp eine verstärkte renale Entzündungsaktivität auf, mit vermehrter Infiltration renaler Makrophagen und erhöhter renaler Expression inflammatorischer Chemokine und Zytokine. Dies war von einer verstärkten renalen Expression von Fibrosemarkern begleitet, was auf einen vermehrten fibrotischen Gewebeumbau in den Nieren der diabetischen A20+/- Versuchstiere hinweist.

Bereits in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnte im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis ein bei A20-Defizienz verschlechterter Verlauf der Immunkomplex-Glomerulonephritis nachgewiesen werden, mit verstärkter renaler Entzündung und Fibrose, aber auch damit einhergehendem vermehrten renalen Zelltod (98, 99). Auch im renalen Ischämie-Reperfusionsmodell wurde eine A20-vermittelte Reduktion von akuter tubulärer Nekrose und Inflammation beschrieben (152). Tatsächlich erhöhen auch beim Menschen A20-Mutationen das Risiko, entzündliche Autoimmunerkrankungen zu entwickeln. Dies wurde insbesondere durch die prädisponierende Assoziation bestimmter A20-Polymorphismen mit dem Auftreten eines systemischen Lupus erythematodes gezeigt (153-155). Ein nephroprotektiver Effekt von A20 könnte hierbei sowohl auf dem Schutz der Podozyten, wie bei Sun et al. im Lupusnephritis Modell nachgewiesen (156, 157), als auch auf dem Schutz tubulärer Epithelzellen, wie von Kunter et al. (158) und da Silva et al. (159) beobachtet, beruhen.

Experimentelle A20-Defizienz, die mit einer Aggravierung der renalen Schädigung einherging, oder eine Verbesserung des renalen Phänotyps bei A20-Überexpression war in den jeweiligen Nephropathiemodellen wie der nephrotoxischen Serumnephritis (98, 99) und im Ischämie-Reperfusionsmodell (152) mit gleichsinniger Beeinflussung des auftretenden Zelltods, vor allem der Nekroptose assoziiert. Somit beruhte in diesen Modellen der nephroprotektive Effekt von A20 auf sowohl seiner antientzündlichen als auch Zelltod-inhibierenden Funktion. Die vorliegenden Ergebnisse lassen bei insgesamt geringer Zahl nekrotischer Zellen in diabetischen Nieren und fehlender Beeinflussung des renalen Zelltods in der A20+/- Versuchsgruppe auf eine fehlende

pathophysiologische Rolle der Nekrose einschließlich der Nekroptose in dem hier untersuchten Modell der diabetischen Nephropathie schließen. Dieses Ergebnis bestätigt auch die Daten aus dem ersten Teil der Arbeit, die eine ausbleibende Beeinflussung des Zelltods bei Blockierung der Nekroptose-Signalkaskade in Ripk1kd, Ripk3kd und Mlkl-/- Mäusen zeigen.

Trotz der fehlenden Beeinflussung des renalen Zelltods konnte in dieser Arbeit sehr wohl eine entzündungsbegrenzende Funktion von A20 im Modell der diabetischen Nephropathie nachgewiesen werden. Vergleichbar beschreiben Li et al. im Lupusnephritis-Modell bei A20-Überexpression eine reduzierte Nierenschädigung und renale Entzündung, die mit einer verminderten NF-κB-Aktivierung und einer reduzierten Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms einherging (160). Die in der vorliegenden Arbeit zusätzlich nachgewiesene gesteigerte Expression renaler Fibrosemarker ist demnach gut auf eine zunehmende Entzündungsaktivität bei A20-Depletion zurückzuführen, das zu gesteigerter Organfibrose und zu einer Verschlechterung der Nephropathie führen kann.

4.4.2 Fehlender Effekt der A20-Defizienz auf das Ausmaß der diabetischen Nierenschädigung

Auffällig an den Ergebnissen dieser Arbeit war, dass A20-Defizienz in diabetischen Mäusen zu einer signifikanten Verstärkung der renalen Entzündungsaktivität und Fibrose führte, sich jedoch keine Verschlechterung der funktionellen und strukturellen Parameter der diabetischen Nierenschädigung im Vergleich zum Wildtyp zeigte. Eine mögliche Ursache des fehlenden Nachweises einer verstärkten Nierenschädigung könnte an den Charakteristika des untersuchten Modells liegen. Die verwendeten C57BL/6-Mäuse befinden sich in dem am weitesten verbreiteten genetischen Hintergrund transgener Tiere, mit dem Vorteil eines guten Ansprechens auf STZ. Jedoch sind Mäuse dieses Hintergrunds im Vergleich zu anderen Mausstämmen wenig anfällig, chronische Nierenschädigungen zu entwickeln. So wurde von Ma et al. (161) und Leelahavanichkul et al. (162) eine verbesserte Nierenfunktion und ein geringes Ausmaß der Glomerulosklerose in C57BL/6-Mäuse nach 5/6-Nephrektomie als Modell einer chronischen Nierenerkrankung beschrieben. Auch in anderen renalen Erkrankungsmodellen wie der Proteinexzess-induzierten Nephropathie zeigte sich bei weiblichen C57BL/6-Mäusen keine und in Männchen eine nur gering ausgeprägte Albuminurie, mit besser erhaltener glomerulärer Filtrationsbarriere im Vergleich zu Mäusen anderer genetischer Hintergründe (163). Darin könnte der Grund liegen, dass sich im hier untersuchten Modell der diabetischen Nephropathie nur eine relativ milde renale Schädigung entwickelte. Bei bereits nachweisbar gesteigerter renaler Entzündung und Fibrosierung in diabetischen A20+/- Mäusen hätte möglicherweise eine verlängerte Versuchsdauer signifikante Unterschiede im Ausmaß der Nierenschädigung aufzeigen können. Alternativ könnte ein anderes diabetisches Nephropathiemodell mit stärkerer Nierenschädigung untersucht werden. Möglich wäre ein Modell mit genetisch veränderten Versuchstieren, die bereits kurz nach Geburt spontan einen Diabetes entwickeln (164), was zu einem längeren Bestehen der hyperglykämischen Stoffwechsellage und vermehrter renaler Schädigung führt. Alternativ könnte eine einmalige Injektion von STZ in höherer Dosierung zu einem aggressiveren Verlauf mit gegebenfalls stärkerem renalen Schaden führen. Die größten Nachteile sind wie weiter oben schon erwähnt, entweder die Notwendigkeit des Einkreuzens der verwendeten transgenen Tiere in den entsprechenden Mausstamm des Diabetesmodells oder eine stärkere Toxizität mit vermehrt moribundem Verlauf.

4.5 Limitationen der Arbeit

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen auf eine mögliche proinflammatorische Rolle von MLKL und eine entzündungsbegrenzende Funktion von A20 im Verlauf der progredienten diabetischen Nierenschädigung hin. Auch der Phänotyp der diabetischen Ripk1kd- und Ripk3kd-Mäuse mit Verbesserung einzelner Parameter der renalen Entzündung legen mögliche proinflammatorische Effekte von RIPK1 und RIPK3 nahe, die durch ihre Kinaseaktivität vermittelt werden. Allerdings konnte in keiner der transgenen Versuchsgruppen eine signifikante Veränderung wichtiger funktioneller Parameter der diabetischen Nephropathie aufgezeigt werden. Um zu bestätigen, dass Kinase-aktives Ripk1 und Ripk3 sowie MLKL Nekroptose-unabhängige, proinflammatorische Effekte vermitteln, die tatsächlich zur diabetischen Nierenschädigung beitragen, müssen daher weitere Untersuchungen folgen. Gleiches gilt für den Nachweis eines möglichen nephroprotektiven Effekts von A20 bei der diabetischen Nephropathie. Hierfür könnten wie bereits diskutiert zum einen eine verlängerte Beobachtungsdauer oder ein alternatives Modell mit stärkerer renaler Schädigung gewählt werden. Des Weiteren sollte der Einschluss größerer Tierzahlen zu einer höheren statistischen Trennschärfe und damit zu signifikanteren Ergebnissen führen. Die hier vorgelegten Ergebnisse stellen dabei eine gute Grundlage für eine entsprechende Berechnung notwendiger Gruppengrößen dar.

Zudem lassen sich anhand der angewendeten Methoden und gewonnen Daten die zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen der pro- bzw. antiinflammatorischen Effekte nicht herleiten. So bleibt unklar, welcher Zelltyp für den jeweiligen Phänotyp verantwortlich ist. Um zu unterscheiden, ob die Mlkl- bzw. A20-Defizienz systemisch in Leukozyten oder lokal in renalen Zellen wie Podozyten ausschlaggebend ist, wären hier ergänzende Untersuchungen an Knochenmark-chimären Mäusen oder Zelltyp-spezifischen transgenen Mäusen notwendig gewesen, wobei der in beiden Versuchsteilen fehlende Einfluss auf den renalen Zelltod bei gleichermaßen reduzierter renaler Inflammation eher für einen Effekt in Leukozyten sprechen könnte.

Schließlich wurde in der vorliegenden Arbeit nicht genauer auf den Einfluss der Genotypen auf die STZ-Wirkung und damit Effektivität der Diabetes-Induktion eingegangen. Die unterschiedlichen Ansprechraten zwischen transgenen Versuchstieren und dem Wildtyp legen nahe, dass Kinase-aktives RIPK1 und RIPK3 sowie MLKL zum STZ-induzierten Untergang der β -Zellen beitragen, sodass die Rolle der Nekroptose bei der STZ-induzierten β -Zell-Nekrose im Pankreas näher untersucht werden sollte.

4.6 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit eine erfolgreiche Etablierung des diabetischen Modells durch STZ-Applikation in den verwendeten transgenen Versuchstieren erreicht werden. Die erhobenen Daten weisen auf einen möglichen nephroprotektiven Effekt einer Mlkl-Defizienz bei der diabetischen Nierenschädigung hin. Dieser scheint interessanterweise nicht auf einer verminderten Nekroptose, sondern auf einer reduzierten renalen Entzündungsreaktion in den Mlkl-defizienten Tieren zu beruhen. Auch die Untersuchung von diabetischen Mäusen ohne Ripk1- oder Ripk3-Kinaseaktivität ergab eine Reduktion einzelner renaler Entzündungsparameter, ohne jedoch den renalen Schaden zu beeinflussen. In ähnlicher Weise beeinflusste eine Defizienz des Nekroptose- und entzündungshemmenden A20-Moleküls nicht das Ausmaß des renalen Zelltods, führte aber in den A20-defizienten diabetischen Mäusen zu einer deutlich gesteigerten renalen Inflammation und vermehrten Fibrose. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Nekroptose, zumindest in dem hier untersuchten diabetischen Nephropathie-Modell im Gegensatz zu anderen Nierenerkrankungen wie der Immunkomplex-Glomerulonephritis, keine entscheidende pathophysiologische Rolle bei der Vermittlung des diabetischen Nierenschadens spielt. Dennoch scheinen die intrazellulären Nekroptose-Mediatoren RIPK1 und RIPK3 mit ihrer Kinaseaktivität und vor allem das Nekroptose-Effektormolekül MLKL inflammatorische Effekte zu vermitteln, die zur renalen Schädigung bei diabetischer Nephropathie beitragen können. Entsprechend konnte keine Nekroptose-inhibierende, jedoch eine entzündungshemmende Funktion von A20 bei der diabetischen Nephropathie nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit identifizieren MLKL und A20 als potenzielle Zielmoleküle pharmakologischer Therapiestrategien zur Reduzierung des diabetischen Nierenschadens. Weitere Untersuchungen an anderen Diabetes-Modellen wie zum Beispiel auch der db/db-Maus mit Typ 2-ähnlichem Diabetes sollten folgen, um diese Daten zu bestätigen. Bei Wahl eines Diabetesmodells mit stärker ausgeprägtem renalem Schaden könnte neben Unterschieden in funktionellen Parametern auch ein möglicher Einfluss von MLKL und A20 auf das Ausmaß von renalem Zelltod und Nekroptose besser evaluiert und diese möglicherweise doch als ein pathophysiologischer Faktor bei der diabetischen Nephropathie charakterisiert werden. Zudem könnte der Beitrag der Nekroptose zur diabetischen Nierenschädigung ergänzend durch alternative Hemmung der nekroptotischen Signalkaskade untersucht werden. So könnte die diabetische Nephropathie anstatt an Ripk3kd-Mäusen mit fehlender Kinaseaktivität auch an Ripk3-/- Versuchstieren mit einem vollständigen Knockout des Proteins (165) evaluiert werden. Zudem wären in Ergänzung zur Analyse von Ripk1kd-Mäusen Untersuchungen mit dem Nekroptose-Inhibitor Nec-1s durchführbar (93), um die Rolle der Nekroptose bei der diabetischen Nierenschädigung weiter zu charakterisieren. Auch der Wirkstoff Necrosulfonamid als Inhibitor von MLKL (166) könnte eingesetzt werden.

Weitere Studien sollten durchgeführt werden, um die Rolle der Nekroinflammation und ihre zugrundeliegenden Mechanismen bei der diabetischen Nephropathie genauer zu charakterisieren und spezifische therapeutische Ansätze entwickeln zu können.

Literaturverzeichnis

1. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Kidney inter., Suppl. 2013; 3: 1–150.

2. Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, Hirst JA, O'Callaghan CA, Lasserson DS, Hobbs FDR. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease – A Systematic Review and Meta-Analysis. PLOS ONE. 2016;11(7):e0158765.

3. Girndt M, Trocchi P, Scheidt-Nave C, Markau S, Stang A. The Prevalence of Renal Failure. Results from the German Health Interview and Examination Survey for Adults, 2008-2011 (DEGS1). Dtsch Arztebl Int. 2016;113(6):85-91.

4. Frei U, Schober-Halstenberg H-J. Nierenersatztherapie in Deutschland, Jahresbericht 2005/2006. 2006, QuaSi Niere GmbH: Berlin.

5. Gesundheitsforen Leipzig. Transplantationsregister: Datenvalidierungsbericht-Transplantationsmedizinische Daten der Jahre 2006 bis 2016. 2021, Gesundheitsforen Leipzig GmbH: Leipzig.

6. Deutsche Stiftung Organtransplantation (DSO). Jahresbericht Organspende und Transplantation in Deutschland 2020. 2021, Die Stiftung: Frankfurt am Main.

7. Bikbov B, Purcell CA, Levey AS, Smith M, Abdoli A, Abebe M, Adebayo OM, Afarideh M, Agarwal SK, Agudelo-Botero M, Ahmadian E, Al-Aly Z, Alipour V, Almasi-Hashiani A, Al-Raddadi RM, Alvis-Guzman N, Amini S, Andrei T, Andrei CL, Andualem Z, Anjomshoa M, Arabloo J, Ashagre AF, Asmelash D, Ataro Z, Atout MMDW, Ayanore MA, Badawi A, Bakhtiari A, Ballew SH, Balouchi A, Banach M, Barquera S, Basu S, Bayih MT, Bedi N, Bello AK, Bensenor IM, Bijani A, Boloor A, Borzì AM, Cámera LA, Carrero JJ, Carvalho F, Castro F, Catalá-López F, Chang AR, Chin KL, Chung S-C, Cirillo M, Cousin E, Dandona L, Dandona R, Daryani A, Das Gupta R, Demeke FM, Demoz GT, Desta DM, Do HP, Duncan BB, Eftekhari A, Esteghamati A, Fatima SS, Fernandes JC, Fernandes E, Fischer F, Freitas M, Gad MM, Gebremeskel GG, Gebresillassie BM, Geta B, Ghafourifard M, Ghajar A, Ghith N, Gill PS, Ginawi IA, Gupta R, Hafezi-Nejad N, Haj-Mirzaian A, Haj-Mirzaian A, Hariyani N, Hasan M, Hasankhani M, Hasanzadeh A, Hassen HY, Hay SI, Heidari B, Herteliu C, Hoang CL, Hosseini M, Hostiuc M, Irvani SSN, Islam SMS, Jafari Balalami N, James SL, Jassal SK, Jha V, Jonas JB, Joukar F, Jozwiak JJ, Kabir A, Kahsay A, Kasaeian A, Kassa TD, Kassaye HG, Khader YS, Khalilov R, Khan EA, Khan MS, Khang Y-H, Kisa A, Kovesdy CP, Kuate Defo B, Kumar GA, Larsson AO, Lim L-L, Lopez AD, Lotufo PA, Majeed A, Malekzadeh R, März W, Masaka A, Meheretu HAA, Miazgowski T, Mirica A, Mirrakhimov EM, Mithra P, Moazen B, Mohammad DK, Mohammadpourhodki R, Mohammed S, Mokdad AH, Morales L, Moreno Velasquez I, Mousavi SM, Mukhopadhyay S, Nachega JB, Nadkarni GN, Nansseu JR, Natarajan G, Nazari J, Neal B, Negoi RI, Nguyen CT, Nikbakhsh R, Noubiap JJ, Nowak C, Olagunju AT, Ortiz A, Owolabi MO, Palladino R, Pathak M, Poustchi H, Prakash S, Prasad N, Rafiei A, Raju SB, Ramezanzadeh K, Rawaf S, Rawaf DL, Rawal L, Reiner RC, Rezapour A, Ribeiro DC, Roever L, Rothenbacher D, Rwegerera GM, Saadatagah S, Safari S, Sahle BW, Salem H, Sanabria J, Santos IS, Sarveazad A, Sawhney M, Schaeffner E, Schmidt MI, Schutte AE, Sepanlou SG, Shaikh MA, Sharafi Z, Sharif M, Sharifi A, Silva DAS, Singh JA, Singh NP, Sisay MMM, Soheili A, Sutradhar I, Teklehaimanot BF, Tesfay BE, Teshome GF, Thakur JS, Tonelli M, Tran KB, Tran BX, Tran Ngoc C, Ullah I, Valdez PR, Varughese S, Vos T, Vu LG, Waheed Y, Werdecker A, Wolde HF, Wondmieneh AB, Wulf Hanson S, Yamada T, Yeshaw Y, Yonemoto N, Yusefzadeh H, Zaidi Z, Zaki L, Zaman SB, Zamora N, Zarghi A, Zewdie KA, Ärnlöv J, Coresh J, Perico N, Remuzzi G, Murray CJL, Vos T. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. The Lancet. 2020;395(10225):709-33.

8. Hackl D, Kossack N, Schoenfelder T. Prävalenz, Kosten der Versorgung und Formen des dialysepflichtigen Nierenversagens Vergleich chronischen in Deutschland: der Dialyseversorgung innerhalb und außerhalb stationärer Pflegeeinrichtungen Das Gesundheitswesen, 83(10), S 818-828. 2021.

9. Kaier K, Hils S, Fetzer S, Hehn P, Schmid A, Hauschke D, Bogatyreva L, Jänigen B, Pisarski P. Results of a randomized controlled trial analyzing telemedically supported case management in the first year after living donor kidney transplantation - a budget impact analysis from the healthcare perspective. Health Econ Rev. 2017;7(1):1.

10. Gansevoort RT, Correa-Rotter R, Hemmelgarn BR, Jafar TH, Heerspink HJL, Mann JF, Matsushita K, Wen CP. Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. The Lancet. 2013;382(9889):339-52.

11. Pape H, Kurtz A, Silbernagl S. Physiologie. Hrsg. 9., vollständig überarbeitete Auflage. 2019, Thieme: Stuttgart.

12. Behrends J, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S. Duale Reihe Physiologie. Hrsg. 4., unveränderte Auflage. 2021, Thieme: Stuttgart.

13. Levey AS, Eckardt KU, Dorman NM, Christiansen SL, Hoorn EJ, Ingelfinger JR, Inker LA, Levin A, Mehrotra R, Palevsky PM, Perazella MA, Tong A, Allison SJ, Bockenhauer D, Briggs JP, Bromberg JS, Davenport A, Feldman HI, Fouque D, Gansevoort RT, Gill JS, Greene EL, Hemmelgarn BR, Kretzler M, Lambie M, Lane PH, Laycock J, Leventhal SE, Mittelman M, Morrissey P, Ostermann M, Rees L, Ronco P, Schaefer F, St Clair Russell J, Vinck C, Walsh SB, Weiner DE, Cheung M, Jadoul M, Winkelmayer WC. Nomenclature for kidney function and disease: report of a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Consensus Conference. Kidney Int. 2020;97(6):1117-29.

14. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker KH. Prometheus LernAtlas - Innere Organe. Hrsg. 5. Auflage. 2018, Thieme: Stuttgart.

15. Arastéh K, Baenkler H, Bieber C, Brandt R, Chatterjee T, Dill T, Ditting T, Duckert M, Eich W, Ernst S, Fischer-Rasokat U, Fischli S, Fleck R, Fritze D, Füeßl H, Hahn J, Hamm C, Harenberg J, Hengstmann J, Herzog W, Hinkelbein J, Hofmann T, Holstege A, Huck K, Kähler J, Keller M, Kim W, Klingmüller D, Knaevelsrud I, Köster R, Karl-Heinz Kuck K, Christoph Liebetrau C, Löwe B, Loßnitzer N, Mann W, Matzdorff A, Müller-Tasch T, Nienaber C, Nikendei CN, M., Pausch J, Petzsch M, Pfeifer M, Rösch W, Sauer N, Schäfer J, Scherbaum H, Scheurich C, Brigitte Schlehofer B, Schmidt M, Schneider H, Schöffauer M, Schork J, Schuchert A, Schwab M, Schweikert H, Spannagl M, Stern H, Stocker H, Usadel K, Veelken R, Voll R, Wahl P, Wißner E, Zastrow A, Zeuzem S, Ziegler R, Zipfel S. Duale Reihe Innere Medizin, Hrsg. 4., überarbeitete Auflage. 2018, Thieme: Stuttgart.

16. American Diabetes A. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. Diabetes Care. 2020;43(Suppl 1):S14-S31.

17. Klöppel G, Löhr M, Habich K, Oberholzer M, Heitz PU. Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. Surv Synth Pathol Res 1985;4(2):110-25.

18. Herold G. Innere Medizin 2021: 2021, De Gruyter: Köln.

19. Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG) und diabetesDE – Deutsche Diabetes-Hilfe. Deutscher Gesundheitsbericht: Diabetes 2020, Die Bestandsaufnahme. 2019, Verlag Kirchheim + Co GmbH: Mainz.

20. Tamayo T, Brinks R, Hoyer A, Kuss OS, Rathmann W. The Prevalence and Incidence of Diabetes in Germany. Dtsch Arztebl Int. 2016;113(11):177-82.

21. Akhtar M, Taha N, Nauman A, Mujeeb I, Al-Nabet A. Diabetic Kidney Disease: Past and Present. Adv Anat Pathol. 2020;27(2):87-97.

22. Gross JL, de Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani LH, Caramori ML, Zelmanovitz T. Diabetic Nephropathy: Diagnosis, Prevention, and Treatment. Diabetes Care. 2005;28(1):164-76.

23. Groop PH, Thomas MC, Moran JL, Waden J, Thorn LM, Makinen VP, Rosengard-Barlund M, Saraheimo M, Hietala K, Heikkila O, Forsblom C. The Presence and Severity of Chronic Kidney Disease Predicts All-Cause Mortality in Type 1 Diabetes. Diabetes. 2009;58(7):1651-8.

24. Tuttle KR, Agarwal R, Alpers CE, Bakris GL, Brosius FC, Kolkhof P, Uribarri J. Molecular mechanisms and therapeutic targets for diabetic kidney disease. Kidney International. 2022;102(2):248-60.

25. Thomas MC, Brownlee M, Susztak K, Sharma K, Jandeleit-Dahm KA, Zoungas S, Rossing P, Groop PH, Cooper ME. Diabetic kidney disease. Nat Rev Dis Primers. 2015;1:15018.

26. Lin YC, Chang YH, Yang SY, Wu KD, Chu TS. Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease. J Formos Med Assoc. 2018;117(8):662-75.

27. Garcia-Garcia PM, Getino-Melian MA, Dominguez-Pimentel V, Navarro-Gonzalez JF. Inflammation in diabetic kidney disease. World J Diabetes. 2014;5(4):431-43.

28. Perez-Morales RE, Del Pino MD, Valdivielso JM, Ortiz A, Mora-Fernandez C, Navarro-Gonzalez JF. Inflammation in Diabetic Kidney Disease. Nephron. 2019;143(1):12-6.

29. Donate-Correa J, Martin-Nunez E, Muros-de-Fuentes M, Mora-Fernandez C, Navarro-Gonzalez JF. Inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. J Diabetes Res. 2015;2015:948417.

30. Brewster UC, Perazella MA. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. The American Journal of Medicine. 2004;116(4):263-72.

31. Patel S, Rauf A, Khan H, Abu-Izneid T. Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2017;94:317-25.

32. Sharma S, Smyth B. From Proteinuria to Fibrosis: An Update on Pathophysiology and Treatment Options. Kidney and Blood Pressure Research. 2021;46(4):411-20.

33. Reidy K, Kang HM, Hostetter T, Susztak K. Molecular mechanisms of diabetic kidney disease. J Clin Invest. 2014;124(6):2333-40.

34. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nunez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G, Nomenclature Committee on Cell D. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Cell Death Differ. 2009;16(1):3-11.

35. Melino G. The Sirens' song. Nature. 2001;412(6842):23.

36. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. Am J Pathol. 1995;146(1):3-15.

37. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. N Engl J Med. 2009;361(16):1570-83.

38. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007;35(4):495-516.

39. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES, Altucci L, Amelio I, Andrews DW, Annicchiarico-Petruzzelli M, Antonov AV, Arama E, Baehrecke EH, Barlev NA, Bazan NG, Bernassola F, Bertrand MJM, Bianchi K, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Boya P, Brenner C, Campanella M, Candi E, Carmona-Gutierrez D, Cecconi F, Chan FK, Chandel NS, Cheng EH, Chipuk JE, Cidlowski JA, Ciechanover A, Cohen GM, Conrad M, Cubillos-Ruiz JR, Czabotar PE, D'Angiolella V, Dawson TM, Dawson VL, De Laurenzi V, De Maria R, Debatin KM, DeBerardinis RJ, Deshmukh M, Di Daniele N, Di Virgilio F, Dixit VM, Dixon SJ, Duckett CS, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Elrod JW, Fimia GM, Fulda S, Garcia-Saez AJ, Garg AD, Garrido C, Gavathiotis E, Golstein P, Gottlieb E, Green DR, Greene LA, Gronemeyer H, Gross A, Hajnoczky G, Hardwick JM, Harris IS, Hengartner MO, Hetz C, Ichijo H, Jaattela M, Joseph B, Jost PJ, Juin PP, Kaiser WJ, Karin M, Kaufmann T, Kepp O, Kimchi A, Kitsis RN, Klionsky DJ, Knight RA, Kumar S, Lee SW, Lemasters JJ, Levine B, Linkermann A, Lipton SA, Lockshin RA, Lopez-Otin C, Lowe SW, Luedde T, Lugli E, MacFarlane M, Madeo F, Malewicz M, Malorni W, Manic G, Marine JC, Martin SJ, Martinou JC, Medema JP, Mehlen P, Meier P, Melino S, Miao EA, Molkentin JD, Moll UM, Munoz-Pinedo C, Nagata S, Nunez G, Oberst A, Oren M, Overholtzer M, Pagano M, Panaretakis T, Pasparakis M, Penninger JM, Pereira DM, Pervaiz S, Peter ME, Piacentini M, Pinton P, Prehn JHM, Puthalakath H, Rabinovich GA, Rehm M, Rizzuto R, Rodrigues CMP, Rubinsztein DC, Rudel T, Ryan KM, Sayan E, Scorrano L, Shao F, Shi Y, Silke J, Simon HU, Sistigu A, Stockwell BR, Strasser A, Szabadkai G, Tait SWG, Tang D, Tavernarakis N, Thorburn A, Tsujimoto Y, Turk B, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Vander Heiden MG, Villunger A, Virgin HW, Vousden KH, Vucic D, Wagner EF, Walczak H, Wallach D, Wang Y, Wells JA, Wood W, Yuan J, Zakeri Z, Zhivotovsky B, Zitvogel L, Melino G, Kroemer G. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. Cell Death Differ. 2018;25(3):486-541.

40. Püschel G, Kühn H, Kietzmann T, Höhne W, Christ B, Doenecke DK, J. Taschenlehrbuch Biochemie. Hrsg. 2. Auflage. 2018, Thieme: Stuttgart.

41. Sauler M, Bazan IS, Lee PJ. Cell Death in the Lung: The Apoptosis-Necroptosis Axis. Annu Rev Physiol. 2019;81:375-402.

42. Robinson N, Ganesan R, Hegedus C, Kovacs K, Kufer TA, Virag L. Programmed necrotic cell death of macrophages: Focus on pyroptosis, necroptosis, and parthanatos. Redox Biol. 2019;26:101239.

43. Liang X, Chen Y, Zhang L, Jiang F, Wang W, Ye Z, Liu S, Yu C, Shi W. Necroptosis, a novel form of caspase-independent cell death, contributes to renal epithelial cell damage in an ATP-depleted renal ischemia model. Mol Med Rep. 2014;10(2):719-24.

44. Corsetti G, Chen-Scarabelli C, Romano C, Pasini E, Dioguardi FS, Onorati F, Knight R, Patel H, Saravolatz L, Faggian G, Scarabelli TM. Autophagy and Oncosis/Necroptosis Are Enhanced in Cardiomyocytes from Heart Failure Patients. Med Sci Monit Basic Res. 2019;25:33-44.

45. Karunakaran D, Geoffrion M, Wei L, Gan W, Richards L, Shangari P, DeKemp EM, Beanlands RA, Perisic L, Maegdefessel L, Hedin U, Sad S, Guo L, Kolodgie FD, Virmani R, Ruddy T, Rayner KJ. Targeting macrophage necroptosis for therapeutic and diagnostic interventions in atherosclerosis. Sci Adv. 2016;2(7):e1600224.

46. Ito Y, Ofengeim D, Najafov A, Das S, Saberi S, Li Y, Hitomi J, Zhu H, Chen H, Mayo L, Geng J, Amin P, DeWitt JP, Mookhtiar AK, Florez M, Ouchida AT, Fan JB, Pasparakis M, Kelliher MA, Ravits J, Yuan J. RIPK1 mediates axonal degeneration by promoting inflammation and necroptosis in ALS. Science. 2016;353(6299):603-8.

47. Onate M, Catenaccio A, Salvadores N, Saquel C, Martinez A, Moreno-Gonzalez I, Gamez N, Soto P, Soto C, Hetz C, Court FA. The necroptosis machinery mediates axonal degeneration in a model of Parkinson disease. Cell Death Differ. 2020;27(4):1169-85.

48. Ofengeim D, Ito Y, Najafov A, Zhang Y, Shan B, DeWitt JP, Ye J, Zhang X, Chang A, Vakifahmetoglu-Norberg H, Geng J, Py B, Zhou W, Amin P, Berlink Lima J, Qi C, Yu Q, Trapp B, Yuan J. Activation of necroptosis in multiple sclerosis. Cell Rep. 2015;10(11):1836-49.

49. Zille M, Karuppagounder SS, Chen Y, Gough PJ, Bertin J, Finger J, Milner TA, Jonas EA, Ratan RR. Neuronal Death After Hemorrhagic Stroke In Vitro and In Vivo Shares Features of Ferroptosis and Necroptosis. Stroke. 2017;48(4):1033-43.

50. Faust H, Mangalmurti NS. Collateral damage: necroptosis in the development of lung injury. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2020;318(2):L215-L25.

51. Lin B, Jin Z, Chen X, Zhao L, Weng C, Chen B, Tang Y, Lin L. Necrostatin1 protects mice from acute lung injury by suppressing necroptosis and reactive oxygen species. Mol Med Rep. 2020;21(5):2171-81.

52. Li S, Ning LG, Lou XH, Xu GQ. Necroptosis in inflammatory bowel disease and other intestinal diseases. World J Clin Cases. 2018;6(14):745-52.

53. Qian Z, Shuying W, Ranran D. Inhibitory effects of JQ1 on listeria monocytogenes-induced acute liver injury by blocking BRD4/RIPK1 axis. Biomed Pharmacother. 2020;125:109818.

54. Belavgeni A, Meyer C, Stumpf J, Hugo C, Linkermann A. Ferroptosis and Necroptosis in the Kidney. Cell Chem Biol. 2020;27(4):448-62.

55. Anders HJ. Necroptosis in Acute Kidney Injury. Nephron. 2018;139(4):342-8.

56. Chen H, Fang Y, Wu J, Chen H, Zou Z, Zhang X, Shao J, Xu Y. RIPK3-MLKL-mediated necroinflammation contributes to AKI progression to CKD. Cell Death Dis. 2018;9(9):878.

57. Khoury MK, Gupta K, Franco SR, Liu B. Necroptosis in the Pathophysiology of Disease. Am J Pathol. 2020;190(2):272-85.

58. Choi ME, Price DR, Ryter SW, Choi AMK. Necroptosis: a crucial pathogenic mediator of human disease. JCI Insight. 2019;4(15).

59. Dhuriya YK, Sharma D. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. J Neuroinflammation. 2018;15(1):199.

60. Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. Immunity. 2013;38(2):209-23.

61. Tsuchiya Y, Nakabayashi O, Nakano H. FLIP the Switch: Regulation of Apoptosis and Necroptosis by cFLIP. Int J Mol Sci. 2015;16(12):30321-41.

62. Wang L, Chang X, Feng J, Yu J, Chen G. TRADD Mediates RIPK1-Independent Necroptosis Induced by Tumor Necrosis Factor. Front Cell Dev Biol. 2019;7:393.

63. Malireddi RKS, Gurung P, Kesavardhana S, Samir P, Burton A, Mummareddy H, Vogel P, Pelletier S, Burgula S, Kanneganti TD. Innate immune priming in the absence of TAK1 drives RIPK1 kinase activity-independent pyroptosis, apoptosis, necroptosis, and inflammatory disease. J Exp Med. 2020;217(3).

64. Festjens N, Vanden Berghe T, Cornelis S, Vandenabeele P. RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die. Cell Death Differ. 2007;14(3):400-10.

65. Stanger BZ, Leder P, Lee TH, Kim E, Seed B. RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. Cell. 1995;81(4):513-23.

66. Liu Y, Liu T, Lei T, Zhang D, Du S, Girani L, Qi D, Lin C, Tong R, Wang Y. RIP1/RIP3regulated necroptosis as a target for multifaceted disease therapy (Review). Int J Mol Med. 2019;44(3):771-86.

67. Hsu H, Huang J, Shu H-B, Baichwal V, Goeddel DV. TNF-Dependent Recruitment of the Protein Kinase RIP to the TNF Receptor-1 Signaling Complex. Immunity. 1996;4(4):387-96.

68. RIPK1: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8737 [cited August 2021]

69. Grootjans S, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Initiation and execution mechanisms of necroptosis: an overview. Cell Death Differ. 2017;24(7):1184-95.

70. Laurien L, Nagata M, Schunke H, Delanghe T, Wiederstein JL, Kumari S, Schwarzer R, Corona T, Kruger M, Bertrand MJM, Kondylis V, Pasparakis M. Autophosphorylation at serine 166 regulates RIP kinase 1-mediated cell death and inflammation. Nat Commun. 2020;11(1):1747.

71. Yu PW, Huang BCB, Shen M, Quast J, Chan E, Xu X, Nolan GP, Payan DG, Luo Y. Identification of RIP3, a RIP-like kinase that activates apoptosis and NFkB. Current Biology. 1999;9(10):S1-S3.

72. Sun X, Lee J, Navas T, Baldwin DT, Stewart TA, Dixit VM. RIP3, a novel apoptosis-inducing kinase. J Biol Chem. 1999;274(24):16871-5.

73. RIPK3: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11035 [cited August 2021]

74. Moujalled DM, Cook WD, Okamoto T, Murphy J, Lawlor KE, Vince JE, Vaux DL. TNF can activate RIPK3 and cause programmed necrosis in the absence of RIPK1. Cell Death Dis. 2013;4:e465.

75. Mocarski ES, Upton JW, Kaiser WJ. Viral infection and the evolution of caspase 8-regulated apoptotic and necrotic death pathways. Nat Rev Immunol. 2011;12(2):79-88.

76. Tait SW, Oberst A, Quarato G, Milasta S, Haller M, Wang R, Karvela M, Ichim G, Yatim N, Albert ML, Kidd G, Wakefield R, Frase S, Krautwald S, Linkermann A, Green DR. Widespread mitochondrial depletion via mitophagy does not compromise necroptosis. Cell Rep. 2013;5(4):878-85.

77. Czabotar PE, Murphy JM. A tale of two domains – a structural perspective of the pseudokinase, MLKL. The FEBS Journal. 2015;282(22):4268-78.

78. Zhan C, Huang M, Yang X, Hou J. MLKL: Functions beyond serving as the Executioner of Necroptosis. Theranostics. 2021;11(10):4759-69.

79. MLKL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/197259 [cited August 2021]

80. Liu S, Liu H, Johnston A, Hanna-Addams S, Reynoso E, Xiang Y, Wang Z. MLKL forms disulfide bond-dependent amyloid-like polymers to induce necroptosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114(36):E7450-E9.

81. Chen X, Li W, Ren J, Huang D, He WT, Song Y, Yang C, Li W, Zheng X, Chen P, Han J. Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. Cell Res. 2014;24(1):105-21.

82. Dondelinger Y, Declercq W, Montessuit S, Roelandt R, Goncalves A, Bruggeman I, Hulpiau P, Weber K, Sehon CA, Marquis RW, Bertin J, Gough PJ, Savvides S, Martinou JC, Bertrand MJ,

Vandenabeele P. MLKL compromises plasma membrane integrity by binding to phosphatidylinositol phosphates. Cell Rep. 2014;7(4):971-81.

83. TNFAIP3/A20: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7128 [cited August 2021]

84. Makarova KS, Aravind L, Koonin EV. A novel superfamily of predicted cysteine proteases from eukaryotes, viruses and Chlamydia pneumoniae. Trends in Biochemical Sciences. 2000;25(2):50-2.

85. Opipari AW, Boguski MS, Dixit VM. The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor alpha encodes a novel type of zinc finger protein. Journal of Biological Chemistry. 1990;265(25):14705-8.

86. Lork M, Verhelst K, Beyaert R. CYLD, A20 and OTULIN deubiquitinases in NF-kappaB signaling and cell death: so similar, yet so different. Cell Death Differ. 2017;24(7):1172-83.

87. Malynn BA, Ma A. A20: A multifunctional tool for regulating immunity and preventing disease. Cell Immunol. 2019;340:103914.

88. Onizawa M, Oshima S, Schulze-Topphoff U, Oses-Prieto JA, Lu T, Tavares R, Prodhomme T, Duong B, Whang MI, Advincula R, Agelidis A, Barrera J, Wu H, Burlingame A, Malynn BA, Zamvil SS, Ma A. The ubiquitin-modifying enzyme A20 restricts ubiquitination of the kinase RIPK3 and protects cells from necroptosis. Nat Immunol. 2015;16(6):618-27.

89. Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, Eby M, Aravind L, Seshagiri S, Wu P, Wiesmann C, Baker R, Boone DL, Ma A, Koonin EV, Dixit VM. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. Nature. 2004;430(7000):694-9.

90. Seo J, Lee EW, Song J. New role of E3 ubiquitin ligase in the regulation of necroptosis. BMB Rep. 2016;49(5):247-8.

91. Chen W, Wu J, Li L, Zhang Z, Ren J, Liang Y, Chen F, Yang C, Zhou Z, Su SS, Zheng X, Zhang Z, Zhong CQ, Wan H, Xiao M, Lin X, Feng XH, Han J. Ppm1b negatively regulates necroptosis through dephosphorylating Rip3. Nat Cell Biol. 2015;17(4):434-44.

92. Xie Y, Zhu S, Zhong M, Yang M, Sun X, Liu J, Kroemer G, Lotze M, Zeh HJ, 3rd, Kang R, Tang D. Inhibition of Aurora Kinase A Induces Necroptosis in Pancreatic Carcinoma. Gastroenterology. 2017;153(5):1429-43 e5.

93. Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA, Yuan J. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. Nature Chemical Biology. 2005;1(2):112-9.

94. Harris PA, Berger SB, Jeong JU, Nagilla R, Bandyopadhyay D, Campobasso N, Capriotti CA, Cox JA, Dare L, Dong X, Eidam PM, Finger JN, Hoffman SJ, Kang J, Kasparcova V, King BW, Lehr R, Lan Y, Leister LK, Lich JD, MacDonald TT, Miller NA, Ouellette MT, Pao CS, Rahman A, Reilly MA, Rendina AR, Rivera EJ, Schaeffer MC, Sehon CA, Singhaus RR, Sun HH, Swift BA, Totoritis RD, Vossenkamper A, Ward P, Wisnoski DD, Zhang D, Marquis RW, Gough PJ, Bertin J. Discovery of a First-in-Class Receptor Interacting Protein 1 (RIP1) Kinase Specific Clinical Candidate (GSK2982772) for the Treatment of Inflammatory Diseases. J Med Chem. 2017;60(4):1247-61.

95. Li JX, Feng JM, Wang Y, Li XH, Chen XX, Su Y, Shen YY, Chen Y, Xiong B, Yang CH, Ding J, Miao ZH. The B-Raf(V600E) inhibitor dabrafenib selectively inhibits RIP3 and alleviates acetaminophen-induced liver injury. Cell Death Dis. 2014;5:e1278.

96. Fauster A, Rebsamen M, Huber KV, Bigenzahn JW, Stukalov A, Lardeau CH, Scorzoni S, Bruckner M, Gridling M, Parapatics K, Colinge J, Bennett KL, Kubicek S, Krautwald S, Linkermann A, Superti-Furga G. A cellular screen identifies ponatinib and pazopanib as inhibitors of necroptosis. Cell Death Dis. 2015;6:e1767.

97. Liao D, Sun L, Liu W, He S, Wang X, Lei X. Necrosulfonamide inhibits necroptosis by selectively targeting the mixed lineage kinase domain-like protein. MedChemComm. 2014;5(3):333-7.

98. Hoppe J, Müller M, Lux M, Bideak A, Eltrich N, Vielhauer V. The role of A20 in inflammation and cell death driving immune complex glomerulonephritis. 7. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie. 2015, Abstract USB-Stick, ISSN 1863-2262, Poster P204.

99. Hoppe J. Die Rolle von A20 in der Immunkomplex-Glomerulonephritis. Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät. 2022.

100. Berger SB, Kasparcova V, Hoffman S, Swift B, Dare L, Schaeffer M, Capriotti C, Cook M, Finger J, Hughes-Earle A, Harris PA, Kaiser WJ, Mocarski ES, Bertin J, Gough PJ. Cutting Edge: RIP1 kinase activity is dispensable for normal development but is a key regulator of inflammation in SHARPIN-deficient mice. J Immunol. 2014;192(12):5476-80.

101. Mandal P, Berger SB, Pillay S, Moriwaki K, Huang C, Guo H, Lich JD, Finger J, Kasparcova V, Votta B, Ouellette M, King BW, Wisnoski D, Lakdawala AS, DeMartino MP, Casillas LN, Haile PA, Sehon CA, Marquis RW, Upton J, Daley-Bauer LP, Roback L, Ramia N, Dovey CM, Carette JE, Chan FK, Bertin J, Gough PJ, Mocarski ES, Kaiser WJ. RIP3 induces apoptosis independent of pronecrotic kinase activity. Mol Cell. 2014;56(4):481-95.

102. Murphy JM, Czabotar PE, Hildebrand JM, Lucet IS, Zhang JG, Alvarez-Diaz S, Lewis R, Lalaoui N, Metcalf D, Webb AI, Young SN, Varghese LN, Tannahill GM, Hatchell EC, Majewski IJ, Okamoto T, Dobson RC, Hilton DJ, Babon JJ, Nicola NA, Strasser A, Silke J, Alexander WS. The Pseudokinase MLKL Mediates Necroptosis via a Molecular Switch Mechanism. Immunity. 2013;39(3):443-53.

103. Lee EG, Boone DL, Chai S, Libby SL, Chien M, Lodolce JP, Ma A. Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. Science. 2000;289(5488):2350-4.

104. Tonneijck L, Muskiet MH, Smits MM, van Bommel EJ, Heerspink HJ, van Raalte DH, Joles JA. Glomerular Hyperfiltration in Diabetes: Mechanisms, Clinical Significance, and Treatment. J Am Soc Nephrol. 2017;28(4):1023-39.

105. Al-Awar A, Kupai K, Veszelka M, Szucs G, Attieh Z, Murlasits Z, Torok S, Posa A, Varga C. Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. J Diabetes Res. 2016;2016:9051426.

106. Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). Cancer Chemother Rep. 1963;29:91-8.

107. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia. 2007;51(2):216-26.

108. Deutsche Gesellschaft fur Gastroenterologie V-uS, Netzwerk Neuroendokrine Tumoren e V, Bundesorganisation Selbsthilfe NeuroEndokrine Tumoren e V, Deutsche Gesellschaft fur Hamatologie und Medizinische Onkologie e.V uAIOdDKeV, Deutsche Gesellschaft fur Allgemeinund Viszeralchirurgie e V, Deutsche Gesellschaft fur C, Deutsche Gesellschaft fur Endoskopie und Bildgebende V, Deutsche Gesellschaft fur Nuklearmedizin e V, Deutsche Gesellschaft fur Innere M, Deutsche Gesellschaft fur E, Deutsche Gesellschaft fur Palliativmedizin e V, Deutsche Gesellschaft fur E, Deutsche Gesellschaft fur Palliativmedizin e V, Deutsche Gesellschaft fur Innere M, Deutsche Gesellschaft fur E, Deutsche Gesellschaft fur Palliativmedizin e V, Deutsche Gesellschaft fur Pathologie e VBDP, Deutsche Gesellschaft fur interventionelle R, Authors, Collaborators. [Practice guideline neuroendocrine tumors - AWMF-Reg. 021-27]. Z Gastroenterol. 2018;56(6):583-681.

109. Schreiber A, Shulhevich Y, Geraci S, Hesser J, Stsepankou D, Neudecker S, Koenig S, Heinrich R, Hoecklin F, Pill J, Friedemann J, Schweda F, Gretz N, Schock-Kusch D. Transcutaneous measurement of renal function in conscious mice. Am J Physiol Renal Physiol. 2012;303(5):F783-8.

110. Schock-Kusch D, Xie Q, Shulhevich Y, Hesser J, Stsepankou D, Sadick M, Koenig S, Hoecklin F, Pill J, Gretz N. Transcutaneous assessment of renal function in conscious rats with a device for measuring FITC-sinistrin disappearance curves. Kidney Int. 2011;79(11):1254-8.

111. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. Curr Protoc Immunol. 2018;120:5 1 -5 1 11.

112. Van Weemen BK, Schuurs AHWM. Immunoassay using antigen—enzyme conjugates. FEBS Letters. 1971;15(3):232-6.

113. Engvall E PP. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemis-try 1971;8:871–4.

114. Jaffe M. Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsäure im normalen Harn erzeugt, und über eine neue Reaction des Kreatinins Zeitschrift für Physiologische Chemie.1886;10:391–400.

115. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. Nucleic Acids Res. 2004;32(12):e103.

116. Kawakami T, Lichtnekert J, Thompson LJ, Karna P, Bouabe H, Hohl TM, Heinecke JW, Ziegler SF, Nelson PJ, Duffield JS. Resident renal mononuclear phagocytes comprise five discrete populations with distinct phenotypes and functions. J Immunol. 2013;191(6):3358-72.

117. Andersen K, Eltrich N, Lichtnekert J, Anders HJ, Vielhauer V. The NLRP3/ASC inflammasome promotes T-cell-dependent immune complex glomerulonephritis by canonical and noncanonical mechanisms. Kidney Int. 2014;86(5):965-78.

118. Susztak K, Raff AC, Schiffer M, Böttinger EP. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. Diabetes. 2006;55(1):225-33.

119. Kumar D, Robertson S, Burns KD. Evidence of apoptosis in human diabetic kidney. Mol Cell Biochem. 2004;259(1-2):67-70.

120. Shahzad K, Bock F, Al-Dabet MM, Gadi I, Kohli S, Nazir S, Ghosh S, Ranjan S, Wang H, Madhusudhan T, Nawroth PP, Isermann B. Caspase-1, but Not Caspase-3, Promotes Diabetic Nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2016;27(8):2270-5.

121. Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. Jikken Dobutsu. 1980;29(1):1-13.

122. Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. Nature. 1996;379(6566):632-5.

123. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. J Clin Invest. 1969;48(11):2129-39.

124. Lenzen S, Panten U. Alloxan: history and mechanism of action. Diabetologia. 1988;31(6):337-42.

125. Gurley SB, Clare SE, Snow KP, Hu A, Meyer TW, Coffman TM. Impact of genetic background on nephropathy in diabetic mice. Am J Physiol Renal Physiol. 2006;290(1):F214-22.

126. Leiter EH. Multiple low-dose streptozotocin-induced hyperglycemia and insulitis in C57BL mice: influence of inbred background, sex, and thymus. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982;79(2):630-4.

127. Jin HR, Kim WJ, Song JS, Choi MJ, Piao S, Shin SH, Tumurbaatar M, Tuvshintur B, Nam MS, Ryu JK, Suh JK. Functional and morphologic characterizations of the diabetic mouse corpus cavernosum: comparison of a multiple low-dose and a single high-dose streptozotocin protocols. J Sex Med. 2009;6(12):3289-304.

128. Deeds MC, Anderson JM, Armstrong AS, Gastineau DA, Hiddinga HJ, Jahangir A, Eberhardt NL, Kudva YC. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. Lab Anim. 2011;45(3):131-40.

129. Rojas J, Bermudez V, Palmar J, Martinez MS, Olivar LC, Nava M, Tomey D, Rojas M, Salazar J, Garicano C, Velasco M. Pancreatic Beta Cell Death: Novel Potential Mechanisms in Diabetes Therapy. J Diabetes Res. 2018;2018:9601801.

130. Goyal SN, Reddy NM, Patil KR, Nakhate KT, Ojha S, Patil CR, Agrawal YO. Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes - A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. Chem Biol Interact. 2016;244:49-63.

131. Kume E, Fujimura H, Matsuki N, Ito M, Aruga C, Toriumi W, Kitamura K, Doi K. Hepatic changes in the acute phase of streptozotocin (SZ)-induced diabetes in mice. Exp Toxicol Pathol. 2004;55(6):467-80.

132. Dekel Y, Glucksam Y, Elron-Gross I, Margalit R. Insights into modeling streptozotocininduced diabetes in ICR mice. Lab Anim (NY). 2009;38(2):55-60.

133. Yorek MA. Alternatives to the Streptozotocin-Diabetic Rodent. Int Rev Neurobiol. 2016;127:89-112.

134. Mulay SR, Desai J, Kumar SV, Eberhard JN, Thomasova D, Romoli S, Grigorescu M, Kulkarni OP, Popper B, Vielhauer V, Zuchtriegel G, Reichel C, Brasen JH, Romagnani P, Bilyy

R, Munoz LE, Herrmann M, Liapis H, Krautwald S, Linkermann A, Anders HJ. Cytotoxicity of crystals involves RIPK3-MLKL-mediated necroptosis. Nat Commun. 2016;7:10274.

135. Martin-Sanchez D, Fontecha-Barriuso M, Carrasco S, Sanchez-Nino MD, Massenhausen AV, Linkermann A, Cannata-Ortiz P, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A, Sanz AB. TWEAK and RIPK1 mediate a second wave of cell death during AKI. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018;115(16):4182-7.

136. Xu Y, Ma H, Shao J, Wu J, Zhou L, Zhang Z, Wang Y, Huang Z, Ren J, Liu S, Chen X, Han J. A Role for Tubular Necroptosis in Cisplatin-Induced AKI. J Am Soc Nephrol. 2015;26(11):2647-58.

137. Lin Z, Chen A, Cui H, Shang R, Su T, Li X, Wang K, Yang J, Gao K, Lv J, Shen J, Wang S, Qi Y, Guo M, Zhu Y. Renal tubular epithelial cell necroptosis promotes tubulointerstitial fibrosis in patients with chronic kidney disease. Faseb J. 2022;36(12):e22625.

138. Kriz W, Shirato I, Nagata M, LeHir M, Lemley KV. The podocyte's response to stress: the enigma of foot process effacement. Am J Physiol Renal Physiol. 2013;304(4):F333-47.

139. Xu Y, Gao H, Hu Y, Fang Y, Qi C, Huang J, Cai X, Wu H, Ding X, Zhang Z. High glucoseinduced apoptosis and necroptosis in podocytes is regulated by UCHL1 via RIPK1/RIPK3 pathway. Exp Cell Res. 2019;382(2):111463.

140. Ying Z, Pan C, Shao T, Liu L, Li L, Guo D, Zhang S, Yuan T, Cao R, Jiang Z, Chen S, Wang F, Wang X. Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein MLKL Breaks Down Myelin following Nerve Injury. Molecular Cell. 2018;72(3):457-68.e5.

141. Zhang S, Su Y, Ying Z, Guo D, Pan C, Guo J, Zou Z, Wang L, Zhang Z, Jiang Z, Zhang Z, Wang X. RIP1 kinase inhibitor halts the progression of an immune-induced demyelination disease at the stage of monocyte elevation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019;116(12):5675-80.

142. Wu X, Poulsen KL, Sanz-Garcia C, Huang E, McMullen MR, Roychowdhury S, Dasarathy S, Nagy LE. MLKL-dependent signaling regulates autophagic flux in a murine model of nonalcohol-associated fatty liver and steatohepatitis. J Hepatol. 2020;73(3):616-27.

143. Martens S, Bridelance J, Roelandt R, Vandenabeele P, Takahashi N. MLKL in cancer: more than a necroptosis regulator. Cell Death Differ. 2021;28(6):1757-72.

144. Lindenthal A. Die funktionelle Rolle von RIPK1-, RIPK3- und MLKL-vermitteltem Zelltod in der Immunkomplex-Glomerulonephritis. Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät. 2023.

145. Shi Y, Huang C, Zhao Y, Cao Q, Yi H, Chen X, Pollock C. RIPK3 blockade attenuates tubulointerstitial fibrosis in a mouse model of diabetic nephropathy. Sci Rep. 2020;10(1):10458.

146. Linkermann A, Bräsen JH, Himmerkus N, Liu S, Huber TB, Kunzendorf U, Krautwald S. Rip1 (receptor-interacting protein kinase 1) mediates necroptosis and contributes to renal ischemia/reperfusion injury. Kidney Int. 2012;81(8):751-61.

147. Guo C, Fu R, Zhou M, Wang S, Huang Y, Hu H, Zhao J, Gaskin F, Yang N, Fu SM. Pathogenesis of lupus nephritis: RIP3 dependent necroptosis and NLRP3 inflammasome activation. J Autoimmun. 2019;103:102286.

148. Shi Y, Huang C, Yi H, Cao Q, Zhao Y, Chen J, Chen X, Pollock C. RIPK3 blockade attenuates kidney fibrosis in a folic acid model of renal injury. Faseb j. 2020;34(8):10286-98.

149. Lau A, Wang S, Jiang J, Haig A, Pavlosky A, Linkermann A, Zhang ZX, Jevnikar AM. RIPK3-mediated necroptosis promotes donor kidney inflammatory injury and reduces allograft survival. Am J Transplant. 2013;13(11):2805-18.

150. Martin-Sanchez D, Ruiz-Andres O, Poveda J, Carrasco S, Cannata-Ortiz P, Sanchez-Niño MD, Ruiz Ortega M, Egido J, Linkermann A, Ortiz A, Sanz AB. Ferroptosis, but Not Necroptosis, Is Important in Nephrotoxic Folic Acid-Induced AKI. J Am Soc Nephrol. 2017;28(1):218-29.

151. Newton K, Dugger DL, Maltzman A, Greve JM, Hedehus M, Martin-McNulty B, Carano RA, Cao TC, van Bruggen N, Bernstein L, Lee WP, Wu X, DeVoss J, Zhang J, Jeet S, Peng I, McKenzie BS, Roose-Girma M, Caplazi P, Diehl L, Webster JD, Vucic D. RIPK3 deficiency or catalytically inactive RIPK1 provides greater benefit than MLKL deficiency in mouse models of inflammation and tissue injury. Cell Death Differ. 2016;23(9):1565-76.

152. Lutz J, Luong le A, Strobl M, Deng M, Huang H, Anton M, Zakkar M, Enesa K, Chaudhury H, Haskard DO, Baumann M, Boyle J, Harten S, Maxwell PH, Pusey C, Heemann U, Evans PC. The A20 gene protects kidneys from ischaemia/reperfusion injury by suppressing proinflammatory activation. J Mol Med (Berl). 2008;86(12):1329-39.

153. Liu X, Qin H, Wu J, Xu J. Association of TNFAIP3 and TNIP1 polymorphisms with systemic lupus erythematosus risk: A meta-analysis. Gene. 2018;668:155-65.

154. Gaballah H, Abd-Elkhalek R, Hussein O, El-Wahab SA. Association of TNFAIP3 gene polymorphism (rs5029939) with susceptibility and clinical phenotype of systemic lupus erythematosus. Arch Rheumatol. 2021;36(4):570-6.

155. Zhang MY, Yang XK, Pan HF, Ye DQ. Associations between TNFAIP3 gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus risk: an updated meta-analysis. Hla. 2016;88(5):245-52.

156. Sun L, Zou LX, Han YC, Wu L, Chen T, Zhu DD, Hu P. A20 overexpression exerts protective effects on podocyte injury in lupus nephritis by downregulating UCH-L1. J Cell Physiol. 2019;234(9):16191-204.

157. Sun L, Zou LX, Han YC, Zhu DD, Chen T, Wang J. Role of A20/TNFAIP3 deficiency in lupus nephritis in MRL/lpr mice. Clin Exp Nephrol. 2020;24(2):107-18.

158. Kunter U, Daniel S, Arvelo MB, Choi J, Shukri T, Patel VI, Longo CR, Scali ST, Shrikhande G, Rocha E, Czismadia E, Mottley C, Grey ST, Floege J, Ferran C. Combined expression of A1 and A20 achieves optimal protection of renal proximal tubular epithelial cells. Kidney Int. 2005;68(4):1520-32.

159. da Silva CG, Maccariello ER, Wilson SW, Putheti P, Daniel S, Damrauer SM, Peterson CR, Siracuse JJ, Kaczmarek E, Ferran C. Hepatocyte growth factor preferentially activates the anti-inflammatory arm of NF-kappaB signaling to induce A20 and protect renal proximal tubular epithelial cells from inflammation. J Cell Physiol. 2012;227(4):1382-90.

160. Li M, Shi X, Qian T, Li J, Tian Z, Ni B, Hao F. A20 overexpression alleviates pristineinduced lupus nephritis by inhibiting the NF-κB and NLRP3 inflammasome activation in macrophages of mice. Int J Clin Exp Med. 2015;8(10):17430-40.

161. Ma LJ, Fogo AB. Model of robust induction of glomerulosclerosis in mice: importance of genetic background. Kidney Int. 2003;64(1):350-5.

162. Leelahavanichkul A, Yan Q, Hu X, Eisner C, Huang Y, Chen R, Mizel D, Zhou H, Wright EC, Kopp JB, Schnermann J, Yuen PS, Star RA. Angiotensin II overcomes strain-dependent resistance of rapid CKD progression in a new remnant kidney mouse model. Kidney Int. 2010;78(11):1136-53.

163. Ishola DA, Jr., van der Giezen DM, Hahnel B, Goldschmeding R, Kriz W, Koomans HA, Joles JA. In mice, proteinuria and renal inflammatory responses to albumin overload are straindependent. Nephrol Dial Transplant. 2006;21(3):591-7.

164. Pandey S, Dvorakova MC. Future Perspective of Diabetic Animal Models. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. 2020;20(1):25-38.

165. Newton K, Sun X, Dixit VM. Kinase RIP3 is dispensable for normal NF-kappa Bs, signaling by the B-cell and T-cell receptors, tumor necrosis factor receptor 1, and Toll-like receptors 2 and 4. Mol Cell Biol. 2004;24(4):1464-9.

166. Wang Y, Wang J, Wang H, Feng X, Tao Y, Yang J, Cai J. Necrosulfonamide Attenuates Spinal Cord Injury via Necroptosis Inhibition. World Neurosurg. 2018;114:e1186-e91.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Erstellung meiner Dissertation unterstützt haben, insbesondere sind das die Folgenden:

Besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Volker Vielhauer für die Bereitstellung des interessanten Themas wie auch die Möglichkeit der Durchführung vorliegender Dissertation unter seiner Betreuung. Die herzliche Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und die lehrreiche Zeit, die ich im Labor verbringen durfte, stellen wissenschaftlich wie auch menschlich eine große Bereicherung für mich dar.

Auch möchte ich meinen Mitdoktoranden Manuela Mertsch, Wenkai Xia und Alexandra Lindenthal, wie auch Nuru Eltrich für die geduldige Einarbeitung in die unterschiedlichen labortechnischen Methoden, die vielen wertvollen Diskussionen bei aufgetretenen Problemen, sowie die freundschaftliche Unterstützung meinen Dank aussprechen.

Außerdem danke ich allen anderen hier nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern der Klinischen Biochemie für die Hilfsbereitschaft und die freundliche Atmosphäre. Bei Jana Mandelbaum und Dan Draganovici möchte ich mich für die technische Unterstützung bedanken.

Dem Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universitat München möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit und die angebotenen Lehrveranstaltungen im Rahmen des strukturellen Promotionsstudienganges bedanken.

Mein unschätzbarer Dank gilt meinen Eltern, meinem Vater Van Loi Nguyen und meiner Mutter Thi Ngoc An Nguyen, sowie meiner Schwester Ham Duyen Nguyen für ihre bedingungslose Liebe aus der ich immer wieder neue Kraft schöpfe. Ohne eure immerwährende Begleitung und Unterstützung auf meinem gesamten akademischen Werdegang, wie auch eure liebevolle Geduld wäre Studium und Dissertation nicht möglich.



LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN



Eidesstattliche Versicherung

Nguyen, Bao Vi

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Rolle der Nekroinflammation bei Progression der diabetischen Nephropathie

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Aarau, 01.02.2025

Bao Vi Nguyen

Ort, Datum

Unterschrift Bao Vi Nguyen